

Entwicklung von flexiblen Zelllinien für die Produktion rekombinanter Proteine und Retroviren

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Roland Schucht
aus Gardelegen

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Wehland
2. Referent:	Prof. Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	28.02.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	25.09.2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schucht, R.; Coroadinha A. S., Zanta-Boussif M. A.; Carrondo M.; Hauser H.; Wirth D. (2006). A new generation of retroviral producer cells: Predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors. *Molecular Therapy* 14(2):285-92

Coroadinha, A.S; Schucht, R.; Norton, L.; Wirth, D.; Hauser, H.; Carrondo, M. (2006). The use of recombinase cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency in transgene exchange. *Journal of Biotechnology* 124(2):457-68

Patente

Wirth, D.; Hauser, H.; Schucht, R. (2004). Method for the generation of virus producing cell lines. Patent No. 04025919.4- (eingereicht am 02.11.2004)

Tagungsbeiträge

Schucht, R.; Hauser H.; Wirth, D.: Novel modular retroviral packaging cells for predictable retroviral titers. (Vortrag) 12th meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT) Tampere, Finland (2004)

Schucht, R.; Hauser H.; Wirth, D.: Establishment of stable and flexible protein expression cell lines by Flp-mediated site-specific integration. (Vortrag) 7th Conference on Protein Expression in Animal Cells (PEACE) Kreta, Griechenland (2005)

Schucht, R.; Hauser H.; Wirth, D.: Retroviral producer cell lines – the next generation. (Poster) 13th meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT) Prag, Tschechische Republik (2005)

Inhalt

Zusammenfassung	V
1 Einleitung	1
1.1 Die konventionelle Etablierung von Produzentenzelllinien	2
1.1.1 Die zufällige Integration des Expressionsvektors.....	2
1.1.2 „Flp-in“-Zelllinien	3
1.2 Das Kassettenaustauschsystem	6
1.2.1 Definierter Austausch von Expressionskassetten	6
1.2.2 Die „Tag und Targeting“-Strategie	7
1.3 Retroviren in der Gentherapie.....	9
1.3.1 Verpackungszellen.....	9
1.3.2 Vektorsysteme	12
1.4 Aufgabenstellung.....	13
2 Ergebnisse	15
2.1 Die Strategie	15
2.2 Markierung und Isolierung von hochexprimierenden chromosomalen Loci in verschiedenen Zelllinien	18
2.2.1 Produktion von pTAGeGFP Markerviren zum Auffinden hochexprimierender Loci	18
2.2.2 Langzeitstabilität der infizierten Zellen	19
2.2.3 Isolierung und Charakterisierung von hochexprimierenden Klonen	21
2.2.4 Die vorgestellte Strategie führt zu einer geringen Diversität der isolierten CHO- K1-Klone.....	23
2.2.5 Uniforme Expression der isogenen BHK-21 und HEK293-Subklone nach Kassettenaustausch	25
2.3 Die Produktion von rekombinanten Antikörpern	29
2.3.1 Etablierung verschiedener Vektorvarianten	30
2.3.2 BHK-21 und CHO-K1-Subklone zeigen in Abhängigkeit vom Austauschvektor Rekombinationen	31
2.3.3 Vergleich der Antikörperexpression in verschiedenen Zelllinien	33
2.3.4 Der Aufbau des Austauschvektors kann die Stabilität der Expression beeinflussen	35
2.4 Die Etablierung einer retroviralen Produzentenzelllinie	38
2.4.1 Etablierung der Masterzelllinie Flp293A	39
2.4.2 Evaluierung von retroviralen Austauschvektoren.....	41
2.4.3 Der Kassettenaustausch führt zu einer homogenen Virusproduktion der isogenen Subklone	45
2.4.4 Nachweis der Verpackung und Transduktion unspezifischer RNA durch Retroviren.....	48
2.4.5 Herstellung eines therapeutischen Vektors	49

2.4.6	Der SIN-Vektor ermöglicht einen hohen und stabilen Titer	52
3	Diskussion	56
3.1	Markierung von chromosomalen Loci und Stabilität des proviralen Vektors	56
3.2	Effizienz des Kassettenaustauschs	57
3.2.1	Die Kombination von heterologen FRT-Sequenzen und Selektionsfalle führt zu 100% Austauscheffizienz	57
3.2.2	Die Konstruktion des Austauschvektors beeinflusst die Aktivierung des Neomycinresistenzgens und die Expression der Austauschkassette	59
3.3	Homogene und vorhersagbare Expression der isogenen Subklone	61
3.4	Besonderheiten der CHO-K1-Zellen	62
3.4.1	Die retrovirale Markierung mit pTAGEGFP führt zu einer geringen Diversität der Parentalklone	62
3.4.2	CHO-K1-Klone zeigen eine instabile Expression vor und nach dem Kassettenaustausch	64
3.5	Die Produktion von rekombinanten Antikörpern	66
3.5.1	Die verwendeten Antikörpervektoren limitieren eine hohe spezifische Produktivität	67
3.5.2	Die Vektorkonstruktion beeinflusst die Stabilität der Genexpression	69
3.5.3	Der Aufbau der Antikörperkassette kann zu genomischer Instabilität in Subklonen von BHK-21 und CHO-K1 führen	71
3.6	Die Anwendung des Kassettenaustauschsystems zur Produktion von retroviralen Vektoren	71
3.6.1	Die vorgestellte Strategie ermöglichte die Etablierung der stabilen Produzentenzelllinie Flp293A	72
3.6.2	Der Kassettenaustausch erlaubt eine flexible und effektive Produktion verschiedener retroviraler Vektoren	73
3.6.3	Das Austauschsystem bietet Vorteile für die Produktion therapeutischer Vektoren	74
3.6.4	Eine Transduktion des Neomycinresistenzgens kann durch den Vektoraufbau vermieden werden	75
3.7	Limitationen des Markierungssystems und mögliche Verbesserungen	77
3.8	Ausblick	80
3.8.1	Anwendung der vorgestellten Strategie für eine flexible und hohe Proteinexpression	80
3.8.2	Erweiterung der Masterzelllinie durch ein austauschbares <i>env</i> -Protein	81
3.8.3	Etablierung einer Helferzelllinie zur stabilen Produktion von HIV1-lentiviralen Vektoren	83
4	Material und Methoden	84
4.1	Geräte	84
4.2	Material	85

4.3	Allgemeine Grundtechniken	85
4.3.1	Sterilisation durch Hitze	85
4.3.2	Sterilisation durch Filtration.....	86
4.3.3	Phenolisieren von DNA	86
4.3.4	Fällung von DNA	86
4.4	Modifizierung von DNA.....	86
4.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	86
4.4.2	Auffüllen von 5'-überstehenden Enden.....	86
4.4.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	87
4.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten	87
4.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	87
4.4.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Quiagen)	87
4.5	Southern Blot Analyse.....	88
4.5.1	Random priming mit „Rediprime DNA Labelling System“ (Amersham Life Science)	88
4.5.2	Herstellung eines Markers aus λ -DNA	88
4.5.3	Isolierung von hochmolekularer DNA (HMW-DNA) aus Säugerzellen	88
4.5.4	Restriktionsverdau der HMW-DNA	89
4.5.5	DNA-Transfer	89
4.5.6	Hybridisierung der transferierten DNA	89
4.5.7	Re-Hybridisierung.....	90
4.6	Arbeiten mit Escherichia coli.....	90
4.6.1	Verwendete Stämme	90
4.6.2	Medien	90
4.6.3	Herstellung von Agarplatten.....	90
4.6.4	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	91
4.6.5	Elektrotransformation kompetenter Bakterien.....	91
4.6.6	Konservierung von Bakterien.....	91
4.6.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab.....	91
4.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Qiagen)	92
4.7	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	92
4.7.1	Verwendete Zelllinien	92
4.7.2	Grundmedien	93
4.7.3	Kulturmedien	94
4.7.4	Kultivierung von Säugerzellen	94
4.7.5	Zellzahlbestimmung	94
4.7.6	Langzeitlagerung von Säugerzellen.....	94
4.7.7	Durchflusszytometrie (FACS) zur Analyse und Zellsortierung	95
4.7.8	Gentransfermethoden	95
4.7.9	Bestimmung des retroviralen Titers	96
4.7.10	Immunfluoreszenzfärbung	97
4.8	Proteinanalytik	97
4.8.1	Zellaufschluss.....	97
4.8.2	Nachweis von β -Galaktosidase	97
4.8.3	Analyse der Antikörperexpression mittels ELISA	98

5	Vektoren	100
5.1	Verwendete Vektoren	100
5.2	Hergestellte Vektoren	101
6	Abkürzungen	103
7	Literaturverzeichnis	105

Zusammenfassung

Die vorhersagbare und stabile Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen ist von großem Interesse für viele Anwendungen in der Biotechnologie. Konventionelle Methoden zur Etablierung von Klonen mit guten Produktionseigenschaften sind mit einem hohen Screeningaufwand verbunden. Hinzu kommt, dass die Produktionsprozesse für jeden neuen Klon individuell angepasst werden müssen. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer „Tag und Targeting“-Strategie, welche die Etablierung von Masterzelllinien mit einer austauschbaren Expressionskassette beinhaltet.

Für die Generierung dieser Zelllinien wurden chromosomale Loci in HEK293, CHO-K1 und BHK-21-Zellen mit dem Markierungsvektor pTAGeGFP retroviral markiert. Der Vektor transduziert das von heterologen FRT-Erkennungssequenzen flankierte Reportergen eGFP. Die markierten Klone wurden hinsichtlich einer optimalen und stabilen Reportergenexpression untersucht und isoliert. Anschließend wurden über Flp-Rekombinase vermitteltem Kassettenaustausch verschiedene Expressionskassetten in die ausgewählten Loci integriert.

In markierte Loci aller drei Zelllinien konnte so ein Kassettenaustausch mit Vektoren durchgeführt werden, die für beide Ketten eines Immunglobulin G (IgG) kodieren. Durch die Komplettierung des Selektionsmarkers Neomycinphosphotransferase aufgrund der sequenzspezifischen Rekombination konnte der korrekte Kassettenaustausch in 90-100% der Klone gezeigt werden. Die ausgetauschten isogenen Subklone eines Parentalklons zeichneten sich durch ein homogenes Expressionsverhalten aus. Die Stabilität und die Höhe der Expression waren allerdings von der Konstruktion und dem Aufbau der Expressionskassette beeinflusst.

Die Austauschstrategie wurde ebenfalls für die Etablierung einer neuen retroviralen Produzentenzelllinie verwendet. Mehrere (therapeutische) retrovirale Austauschvektoren wurden ebenfalls spezifisch in den markierten Locus einer Masterzelllinie integriert. Mittels dieser Methode konnten hohe und vorhersagbare Virustiter mit allen verwendeten Vektoren erzielt werden.

Die präzise Integration von Expressionskassetten in einen definierten chromosomalen Locus führt zu einer vorhersagbaren Expression, sowohl für die Produktion von rekombinanten Proteinen, als auch für die Generierung von Retroviren. Die Strategie ist flexibel und auf beliebige Austauschvektoren anwendbar. Die Etablierung von Produzentenzellen und des gesamten Produktionsprozesses kann so vereinfacht und die Produktion von Proteinen und therapeutischen Viren für klinische Applikationen beschleunigt werden.

1 Einleitung

Säugerzellen stellen heute das wichtigste System für die Produktion von rekombinanten Proteinen für klinische Anwendungen und die Grundlagenforschung dar (Wurm, 2004). Ihre Fähigkeit Proteine richtig zu falten, zusammenzusetzen und posttranslational zu modifizieren unterscheidet sie von anderen Expressionssystemen wie *Escherichia coli* oder der Hefe *Pichia pastoris* (Tate et al., 2003). Daher werden heute 60-70% aller pharmazeutischen Proteinproduktionen in Säugerzellen durchgeführt (Wurm, 2004). Ein Auszug der industriell hergestellten Proteine ist in der Tabelle 1-1 dargestellt. Viele dieser Produktionen bedienen sich der Hamsterzelllinien CHO-K1 und BHK-21, muriner Myelomazellen (NS0), aber auch menschliche Zelllinien wie HEK293 wurden bereits zugelassen. Optimierte Vektorkonstruktionen und „High-throughput“-Technologien machten die Entwicklung von Zelllinien mit hohen spezifischen Produktivitäten möglich (Andersen und Krummen, 2002). Dafür sind zwei Ansätze verantwortlich. Zum einen hat man die metabolischen Eigenschaften der Zellen mit den technischen Anforderungen optimiert. Auf diesen Ansatz soll im Weiteren nicht eingegangen werden. Zum anderen wurden die Expressionskassetten verbessert und damit die Produktivität erhöht.

Die Produktivität einer Zelle ist allerdings abhängig von der Zahl der Integrate und der Natur der Integrationsstelle(n) des Transgens (Kito et al, 2002). Die konventionelle Etablierung von Produzentenzellen basiert auf der zufälligen Integration der Expressionskassetten. Die Integrationsstelle, die Anzahl der integrierten Kopien und die Höhe der Genexpression können nicht vorhergesagt werden (Barnes et al., 2003). Die Integration eines Transgens in das Chromatin der Wirtszelle kann zum „Positionseffekt“ führen. Dieser Effekt bestimmt das Expressionsverhalten der Klone. Das Resultat sind Variationen der Expression in verschiedenen Klonen, die von nicht-homogener Expression bis zum kompletten Gen-Silencing reichen (Martin und Whitelaw, 1996).

Eines der technisch wichtigsten Kriterien einer erfolgreichen Produktionszelllinie ist die Stabilität der rekombinanten Proteinexpression. Sie beeinflusst maßgeblich die Effektivität des Prozesses. Wenn dieses Kriterium nicht erfüllt werden kann, ergeben sich Nachteile in der Ausbeute (Barnes et al., 2003). Aber auch die Genehmigung des Herstellungsprozesses durch die zuständigen Behörden (z.B. *Food and Drug Administration, FDA*) ist aufgrund einer instabilen Produktion gefährdet (Fann et al., 2000).

Die Herstellung von rekombinanten Viren kann als Spezialfall einer Proteinproduktion angesehen werden. Eine effiziente Zelllinienetablierung und eine stabile Expression sind auch

für die Produktion von therapeutischen retroviralen Vektoren erwünscht. Ähnlich wie für die biotechnologische Proteinexpression müssen viele Regularien erfüllt werden, bevor diese Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie zugelassen werden. Die konventionelle Methode zur Herstellung einer Produzentenzelllinie ist auch hier die Transfektion des retroviralen Vektors in eine Helferzelllinie und die anschließende Isolierung von hochtitrigen Klonen. Dies ist insbesondere schwierig, wenn das Transgen nicht direkt detektiert und für die Selektion verwendet werden kann (Loew et al., 2004).

Produkt	Firma/Referenz	Zelllinie
Blutgerinnungsfaktoren (VII, VIII, IX)	Ceneton, Novo-Nordisk	BHK, CHO
DNase (Zystische Fibrose)	Roche	CHO
Erythropoietin	Boehringer	CHO
Follikel stimulierendes Hormon	Serono/Organon	CHO
Wachstumshormone	Genentech	CHO
Interleukin 11-Antagonist	Wyeth	ROMI 8866*
Interferon- β	Biogen/Serono	CHO
Laminin	Kariya et al. (2002)	HEK293*

Tabelle 1-1: Übersicht einiger rekombinanter Proteinproduktionen und der Produktionszelllinie (Auszüge aus Schmidt, 2004). * humane Zelllinien, während CHO und BHK aus dem Hamster stammen

1.1 Die konventionelle Etablierung von Produzentenzelllinien

1.1.1 Die zufällige Integration des Expressionsvektors

Die Entwicklung von Produzentenzelllinien verläuft größtenteils nach dem gleichen Schema (Abbildung 1.1): Zunächst wird das rekombinante Gen mit den notwendigen Transkriptionselementen in die Zellen transferiert. Zusätzlich wird ein Selektionsmarker ko-transferiert, der entweder vom gleichen oder einem zweiten Plasmid kodiert wird (Gurtu et al., 1996). Typischerweise exprimieren aber nur etwa 5-30% der transfizierten Zellen das

rekombinante Protein (Xiong et al., 2005). Von diesen Zellen müssen durch Selektion und Subklonierung die Klone mit den besten Expressionseigenschaften isoliert werden. In der Regel müssen mehrere Selektionsrunden gefahren werden, um gute Produzentenklone zu finden (Kim S. J. et al., 1998). Diese Prozedur ist sehr zeitaufwendig und je nach zu exprimierendem Protein mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden. Vom Gentransfer bis zur Produktion im größeren Maßstab können mehr als 12 Monate vergehen.

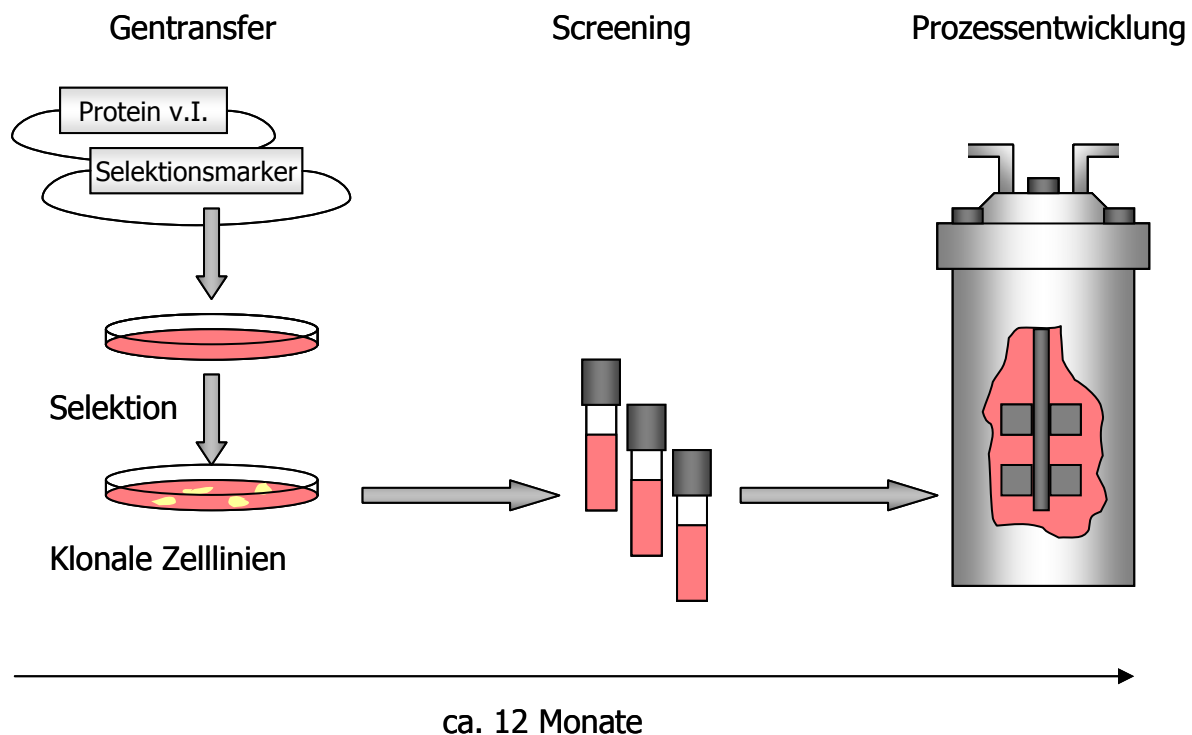


Abbildung 1.1: Die klassische Methode der Zelllinienentwicklung für die Produktion des gewünschten Proteins (v.I.). Nach dem Gentransfer von Selektionsmarker und Expressionsplasmid werden die Wirtszellen selektiert und subkloniert. Anschließend erfolgen ein Screening nach dem höchstproduzierenden Klon und die Prozessentwicklung von der Spinnerflasche bis zum Bioreaktor. (nach Wurm, 2004).

Der eigentliche Nachteil an diesem Verfahren, mit dem Biotechnologieunternehmen konfrontiert sind, ist die Tatsache, dass die langwierige und kostenintensive Screeningprozedur für jedes neue Protein wiederholt werden muss. Eine generelle Strategie für die zeitnahe Zelllinienetablierung existiert noch immer nicht (Yoshikawa et al., 2000).

1.1.2 „Flp-in“-Zelllinien

Die Proteinexpression konventionell etablierter Zelllinien ist das Resultat zufälliger Integrationen der Expressionskassette in das Genom. Die Natur und die Anzahl der

Integrationsorte bestimmen Stabilität und Höhe der spezifischen Produktivität. Eine Möglichkeit die von zufälligen Integrationen hervorgerufenen Probleme zu umgehen, ist die gezielte Integration in vordefinierte Zellen. Dies kann durch Rekombinase vermitteltes „Gentargeting“ mittels sequenzspezifischer Rekombination erzielt werden. Zunächst werden Zellen mit einem Vektor markiert, welcher Rekombinationssequenzen enthält. Die am häufigsten verwendeten sequenzspezifischen Rekombinationssysteme sind das Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 und das FLP/FRT-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welches in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam. Diese Systeme sind unabhängig von endogenen Faktoren die für eine homologe Rekombination benötigt werden. Sie bestehen aus zwei Komponenten, der Rekombinase Cre bzw. FLP und den Rekombinase-Erkennungsstellen loxP bzw. FRT. Die Rekombinase erkennt diese Sequenzen und katalysiert eine reversible Rekombination zwischen den Erkennungsstellen. Aufgrund der Asymmetrie der „Spacer“-Region innerhalb der Erkennungsstellen besitzen diese eine definierte Ausrichtung. Bei gleicher Orientierung („head-to-tail“) findet eine Exzision der DNA statt (Abbildung 1.2). Sind die Erkennungsstellen auf unterschiedlichen DNA-Molekülen lokalisiert, kommt es zu einer Integration, der Rückreaktion der Exzision (Metzger und Feil, 1999). Das Problem in der Anwendung dieses Systems ist, dass die Exzision thermodynamisch begünstigt ist (Baer und Bode, 2001).

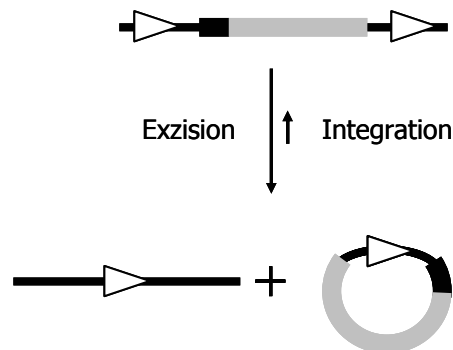


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Exzision bzw. der sequenzspezifischen Rekombination. Bedingt durch thermodynamische Reaktionsvorteile ist die Exzision effizienter als die Integration. Die weißen Dreiecke stellen die Erkennungssequenz der Rekombinase dar.

Dagegen ist die Integration ein intermolekularer Prozess und deshalb vielfach weniger effizient als die Exzision. Sequenzspezifisch integrierte DNA-Bereiche im Genom sind deshalb in Gegenwart der Rekombinasen instabil. Aus diesem Grund sind stringente Selektionssysteme (O’Gorman et al., 1991; Schübeler et al., 1998; Francastel et al., 1999) oder Strategien, die nur ein temporäres Vorhandensein der Rekombinase ermöglichen

(O’Gorman et al., 1991; Logie und Stewart, 1995; Metzger et al., 1995; Kellendonk et al. 1996; Kühn et al., 1995), erforderlich. Eine stringente Selektionsmethode wird durch die Verwendung von sogenannten „Selektionsfallen“ ermöglicht. Die von Invitrogen angebotenen Flp-In-Zellen™ basieren auf einer Hygromycin-Selektionsfalle (Abbildung 1.3). Die Zellen wurden durch die Transfektion eines Markierungsvektors etabliert (*tagging*). Dieser liegt in einer Einzelkopie vor. Der von Invitrogen verwendete Vektor enthält ein Fusionsgen bestehend aus lacZ und dem Zeomycinresistenzgen. Dies erlaubt eine Selektion der markierten Zellen. Zwischen ATG-Startkodon und Selektionsmarker wurde eine FRT-Erkennungsstelle kloniert. Nach der Ko-Transfektion des „Flp-In“-vektors, der für das gewünschte Protein kodiert, mit einem Flp-kodierenden Plasmid, erfolgt die sequenzspezifische Rekombination. Dadurch wird das deletierte Hygromycinresistenzgen des „Flp-In“-Plasmids hinter das ATG-Startkodon des zellulären Integrationsortes gebracht. Als Folge dessen sind nur die korrekt integrierten Subklone hygromycinresistent. Gleichzeitig verlieren sie die Resistenz gegenüber Zeocin sowie die lacZ-Expression.

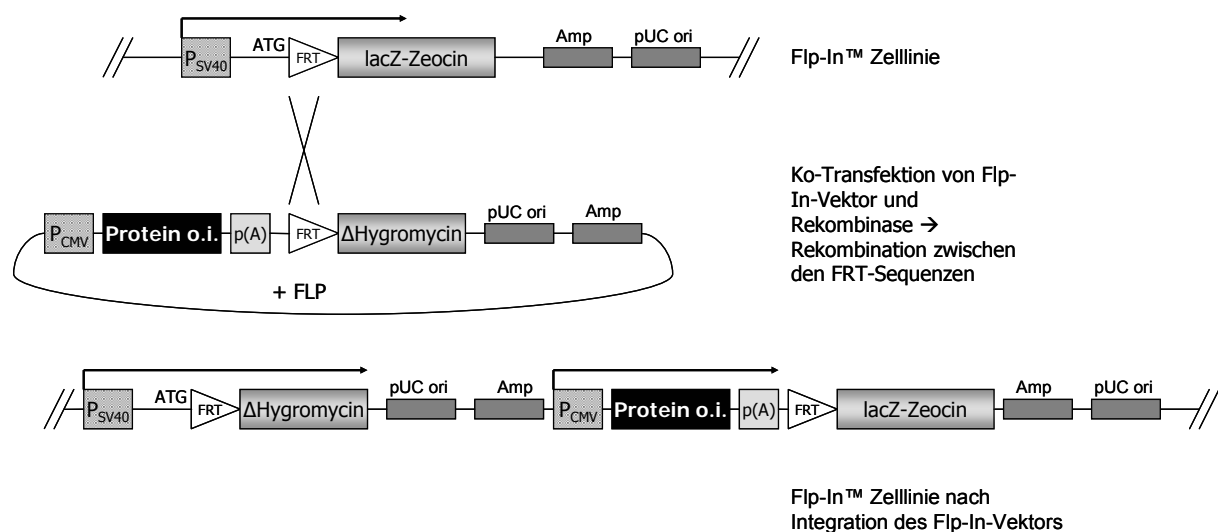


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Flp-In™ Systems von Invitrogen. Durch sequenzspezifische Rekombination des „Flp-In“-Vektors (Expressionsvektor) werden die Zellen hygromycinresistent und verlieren die lacZ-Expression sowie die Resistenz gegenüber Zeocin.

Der Nachteil dieser Methode wird in der Abbildung 1.3 deutlich. Sowohl der gesamte Markierungsvektor als auch der „Flp-In“-Vektor befinden sich nach der Rekombination im Integrationsort. Dies bedeutet, dass neben der gewünschten Proteinexpressionskassette viele nicht mehr benötigte Elemente vorliegen, wie zum Beispiel zwei Kopien des bakteriellen Selektionsmarkers amp^R und des Replikationssignals pUCori, aber auch das inaktivierte lacZ-

Zeocin Fusionsgen. Dies kann zu Rekombinationen und Interferenzen mit dem Transgen und schließlich zum Verlust der Proteinexpression führen (Artelt et al., 1991).

1.2 Das Kassettenaustauschsystem

1.2.1 Definierter Austausch von Expressionskassetten

Eine Möglichkeit die Nachteile des Flp-In™-Systems zu vermeiden und dennoch beliebige DNA-Sequenzen in einen markierten genomischen Locus zu inserieren, stellt der Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch (RMCE: *Recombinase-mediated Cassette Exchange*) dar, welcher auf der Verwendung heterospezifischer Rekombinase-Erkennungsstellen beruht (Abbildung 1.4). Das Flp basierende RMCE-Verfahren wurde erstmals von Schlake und Bode (1994) vorgestellt. Durch verschiedene Mutationen der Spacer-Region wurden FRT-Sequenzen generiert, die ebenfalls von der Flp-Rekombinase erkannt werden, jedoch nicht mit der wildtyp FRT-Sequenz bzw. anderen mutierten FRT-Sequenzen rekombinieren können (Senecoff und Cox, 1986; Umlauf und Cox, 1988; McLeod et al., 1986; Schlake und Bode, 1994). Zwischen homospezifischen FRT-Mutanten ist die Rekombination jedoch weiterhin möglich, ähnlich effizient wie zwischen wildtyp FRT-Sequenzen (Schlake und Bode, 1994).

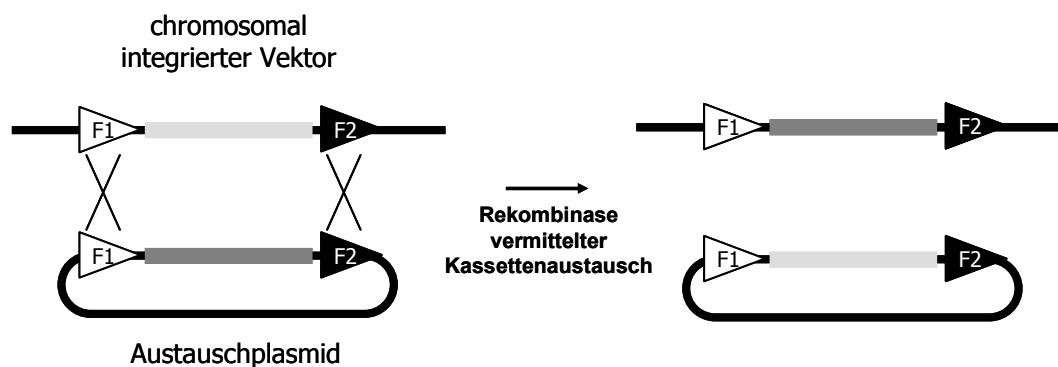


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Kassettenaustausches (RMCE). Die heterospezifischen Rekombinase-Erkennungsstellen F1 und F2 (FRT-Sequenzen) rekombinieren nicht miteinander sondern nur untereinander. Dadurch kann eine DNA-Sequenz, die auf dem Austauschplasmid mit den Erkennungsstellen F1 und F2 flankiert ist, in einen genomischen Locus, der die gleichen Erkennungsstellen aufweist, sequenzspezifisch integriert werden.

Im Unterschied zu den Flp-In™-Zelllinien gewährleistet der Kassettenaustausch die definierte Integration von Expressionskassetten ohne zusätzliche Sequenzen bei gleichzeitigem Verlust des Markierungsvektors. Voraussetzung für einen effizienten Kassettenaustausch ist

allerdings auch hier der Einsatz einer Selektionsfalle, wie das für die Flp-In™ Zelllinien beschriebene Hygromycinselektionssystem.

1.2.2 Die „Tag und Targeting“-Strategie

Gegenüber herkömmlichen Gentransfermethoden wie Transfektion oder Elektroporation bietet der retrovirale Gentransfer mehrere Vorteile. Mit Hilfe statistischer Berechnungen (*multiplicity of infection* = MOI) kann die Menge an viralen Partikeln ermittelt werden die nötig ist, um eine Einzelkopie des Virus pro infizierter Zelle zu erzielen. Dies ist für einen erfolgreichen Kassettenaustausch essentiell, da mögliche Rekombinationen oder auch Interferenzen zwischen verschiedenen markierten Loci vermieden werden müssen. Außerdem ist bei Mehrfachintegraten nicht gewährleistet, dass alle Kassetten ausgetauscht werden.

Retroviren bevorzugen die Integration in transkriptionell offene und aktive Bereiche (Wu et al., 2003), was die Suche und Isolierung von hochexprimierenden Zellen erleichtert. Weiterhin integriert nur das definierte Provirus in das Genom und keine unerwünschten prokaryotischen Sequenzen, die eventuell mit dem Transgen interferieren könnten.

Der natürliche Replikationszyklus von Retroviren ist gekennzeichnet durch eine Verdopplung von Teilen des 3' LTR in den 5' LTR. Diese Eigenschaft wurde von Karreman S. et al. (1996) für die Entwicklung eines Austauschsystems genutzt. Der 3' LTR des von Karreman et al. konstruierten retroviralen Vektors beinhaltet zwei FRT-Sequenzen „in Tandem“, eine Wildtyp (F1) und eine mutierte Form (F5), deren Spacersequenz verändert wurde (Schlake und Bode, 1994). Verhoeyen et al. (2001) klonierten direkt hinter die beiden FRT-Sequenzen ein nicht funktionelles Neomycinresistenzgen (Δneo), dessen ATG-Startkodon und weitere 12 Basenpaare entfernt wurden, sodass keine Transkription des Selektionsmarkers stattfindet. Infiziert man Zellen mit diesem Virus, markiert man also einen chromosomalen Locus (*tagging*), haben die beiden identischen LTRs jeweils eine F1/F5/ Δneo Kasette (Abbildung 1.5, Provirus).

Um das Provirus gegen eine neue Expressionskasette auszutauschen (*targeting*), muss die markierte Zelllinie mit einem Austauschvektor und einem Rekombinase-kodierenden Vektor ko-transfiziert werden. Das Enzym erkennt die FRT-Sequenzen, welche ebenfalls den Austauschvektor flankieren und tauscht das Provirus gegen die neue Kasette aus. Im proviralen Zustand sind die markierten Zellen G418-sensitiv. Das fehlende ATG-Startkodon

wurde in solcher Weise vor die zweite FRT-Sequenz des Austauschvektors kloniert, dass nur eine sequenzspezifische Rekombination zur Komplettierung des Selektionsmarkers führt.

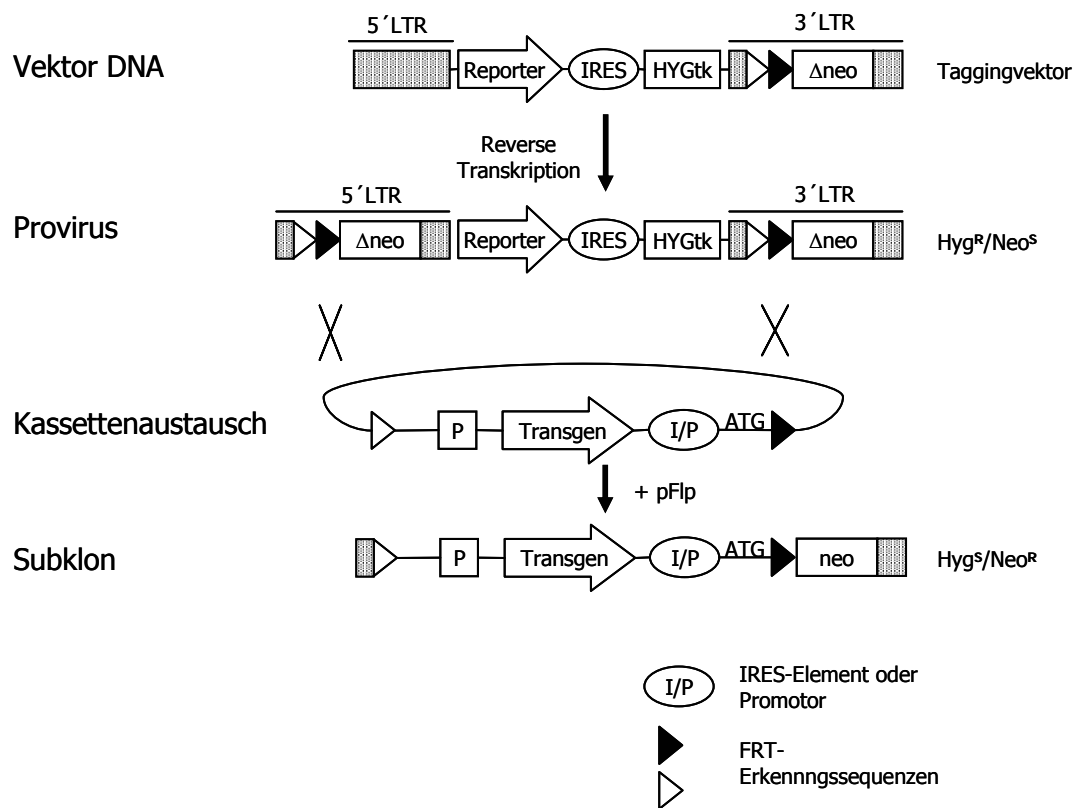


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der „Tag & Targeting“-Strategie. Nach Transfektion eines retroviralen Markierungsvektors in eine Helferzelllinie werden infektiöse Viren produziert. Diese werden benutzt um die Zielzellen zu markieren. Das Reportergen und das Hygromycinresistenzgen dienen zur Isolierung markierter Zellen. Bedingt durch die reverse Transkription besitzt das Provirus im Wirtsgenom zwei Paare der FRT-Sequenzen (weisses Dreieck: F1, schwarzes Dreieck F5) und auch 2 Kopien des nicht funktionellen Neomycinresistenzgens (Δneo). Die markierten Zellen sind hygromycinresistent (Hyg^R) und G418-sensitiv (Neo^S). Nach Transfektion der markierten Zellen mit dem Austauschvektor und einem Flp-kodierenden Plasmid findet der sequenzspezifische Kassettenaustausch statt. Die resultierenden Subklone sind hygromycinsensitiv aber G418-resistent, da das ATG-Startkodon auf dem Austauschvektor den Selektionsmarker komplettiert.

Die Transkription der Neomycinphosphotransferase sollte entweder über ein IRES-Element oder einen internen Promotor vermittelt werden können. Diese Wiederherstellung der Resistenz in ausgetauschten Subklonen erlaubt eine Selektion mittels G418-Kultivierung. Außerdem ist es möglich eine Negativselektion mit Gancyclovir durchzuführen, deren Basis der Verlust von Thymidinkinase ($hyg tk$ -Fusionsprotein) nach dem Austausch ist.

Verhoeyen et al. (2001) konnten an Mausfibroblasten (NIH3T3) zeigen, dass die Kombination von zwei mutierten FRT-Sequenzen mit dem deletierten Selektionsmarker Δneo zu einem 100%igen Austausch der Kasette führt. Der von Verhoeyen et al. verwendete

Markierungsvektorvektor kodiert für das Reportergen β -Galaktosidase. Die Austauschvektoren kodieren ebenfalls für β -Galaktosidase. Es wurde gezeigt, dass die isogenen Zellen nach dem Austausch nicht nur vergleichbare Expressionslevel aufwiesen, sondern auch die hohe Reportergenexpression des parentalen Provirus widerspiegeln. Die Wirkung der chromosomalen Umgebung auf den viralen Promotor wurde also durch die getauschte Kassette nicht beeinflusst.

Die bisherigen Arbeiten hatten allerdings noch nicht das Ziel, biotechnologische Produzentenzellen mit einer Austauschstrategie zu generieren. Es fehlt der Beweis, dass diese Methode auch für eine breite Anwendung zur Zelllinienetablierung geeignet ist.

1.3 Retroviren in der Gentherapie

Unter dem Begriff Gentherapie versteht man das Einbringen von Genen in somatische Zellen zu therapeutische Zwecken, das heißt zur Heilung oder Linderung ererbter genetischer Defekte oder erworbener Krankheiten. Der Gentransfer kann sowohl *ex vivo* (genetische Modifizierung entnommener Zellen und Rückführung in den Organismus) als auch *in vivo* (direkter Transfer des therapeutischen Genmaterials in den Organismus) erfolgen. Die Gentherapie wird zurzeit dann angewandt, wenn keine alternativen Behandlungsmethoden existieren oder nur geringen Erfolg versprechen. Verma und Somia (1997) geben eine Übersicht über Krankheiten, die für eine gentherapeutische Behandlung in Frage kommen.

Retrovirale Vektoren stellen ein wichtiges Werkzeug für den Gentransfer in verschiedene Zelllinien dar (Barquinero et al., 2004) und sind trotz einiger Rückschläge (Hacein-Bey-Abina et al., 2003 a, b) die am häufigsten verwendeten Vektoren auf dem Gebiet der Gentherapie. Die geringe Komplexität ihres Genoms, der einfache Umgang sowie die Fähigkeit stabile Langzeitexpression in transduzierten Säugerzellen zu gewährleisten, sind der Schlüssel für den Erfolg dieser Vektoren (Merten, 2004).

1.3.1 Verpackungszellen

Für die Herstellung von Retroviren werden sogenannte Helfer-oder Verpackungszellen verwendet. Das Genom der Retroviren umfasst etwa 9-10 kb. Durch die Entfernung der *trans*-wirkenden enzymatischen Faktoren gag/pol und env (Helferfunktionen; Tabelle 1-2) kann der nötige Platz für das gewünschte Fremdgen geschaffen werden. Für die Formierung der Viruspartikel müssen die Helferfunktionen allerdings auf anderen Vektoren in die Zelle

transduziert und konstitutiv exprimiert werden. Die von gag kodierten Proteine formen die Matrix des Virus, in welcher später das virale Genom vorliegt (Abbildung 1.6). Das pol-Gen kodiert für die reverse Transkriptase (RT), die das virale RNA-Genom in DNA umwandelt und welches dann durch die Integrase (IN) in das Wirtsgenom integriert wird. Beide gehen aus dem gag/pol-Polyprotein hervor, das durch die virale Protease (PR) gespalten wird. Der Kontakt mit den Rezeptoren der Wirtszelle wird durch das Oberflächenglykoprotein des env-Gens hergestellt. Dieses ist über die Transmembrandomäne (TM) in der Lipidhülle des viralen Partikels verankert. Nach dem Zusammenbau der Virusmatrix fusionieren die Partikel mit der Zellmembran der Wirtszelle und erhalten so die Lipidhülle, welches das funktionelle Virus umgibt.

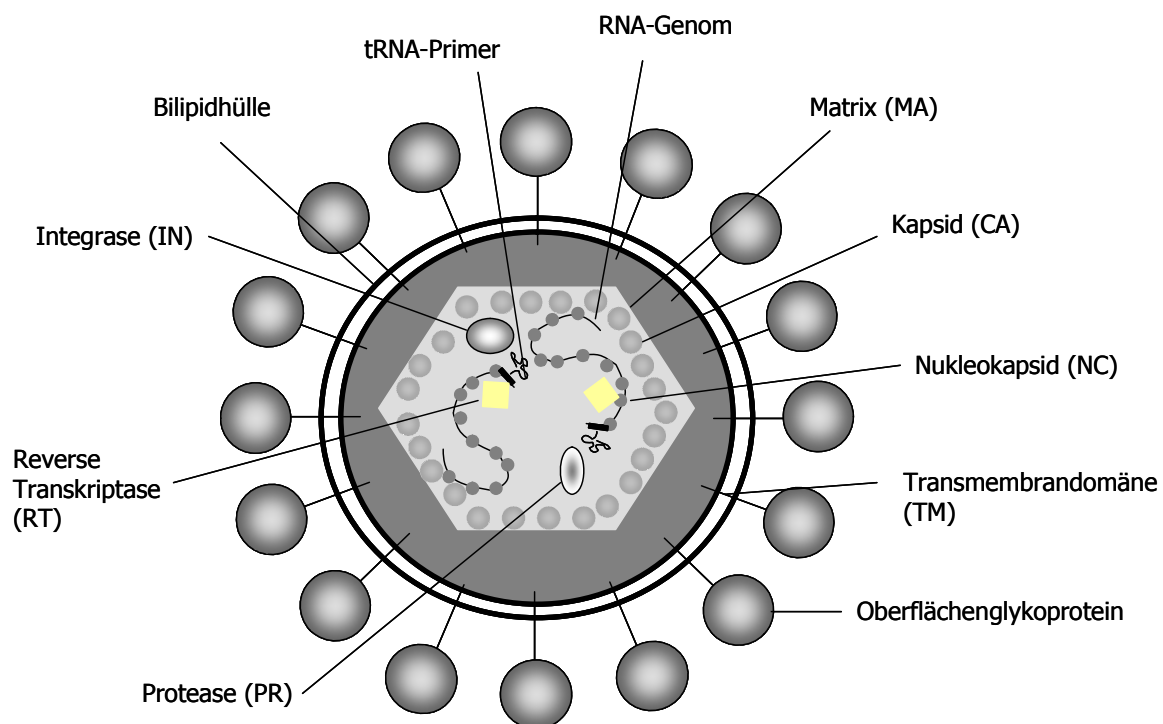


Abbildung 1.6: Struktur eines retroviralen Partikels (nach Coffin, 1992)

Die konventionelle Methode zur Herstellung von therapeutischen Retroviren ist die Transfektion des retroviralen Vektors in die Verpackungszelllinie (Abbildung 1.7). Nach der Transfektion werden infektiöse Partikel freigesetzt. Der Titer, das heißt die Produktivität dieser Zelllinien, hängt stark von der Integrationsstelle des viralen Vektors, beziehungsweise der Anzahl der Vektorkopien ab. So ist für jede Produktion eines neuen Retrovirus eine umfangreiche Suche nach dem optimalen Klon nötig. Gerade für therapeutische Gene kann sich diese Suche aufwendig und schwierig gestalten, besonders wenn kein Selektionsmarker

verwendet werden kann oder darf. Bedeutend einfacher wäre es, wenn der neue therapeutische Vektor in einen zuvor markierten Locus integriert werden könnte, so wie es die Kassettenaustauschstrategie (Kap. 1.2) prinzipiell ermöglicht. Derartige Ansätze sind jedoch bisher nicht verfolgt worden.

Die erste Generation Verpackungszellen, wie zum Beispiel $\Psi 2$ (Mann et al., 1983), transkribierte die Helfergene von einem wildtyp Provirus ohne das Verpackungssignal Ψ , das sich hinter dem 5'LTR befindet und für die Verpackung der nachfolgenden Sequenzen verantwortlich ist. Der Nachteil dieser ersten Verpackungszellen ist allerdings, dass nur ein einziger Rekombinationsschritt zwischen dem rekombinanten Vektor und dem proviralen Integrat in der Bildung von rekombinationskompetenten Retroviren (RCR) resultiert.

Retrovirale Gene	Proteinprodukt
gag	Kapsidproteine: Matrixprotein (MA), Kapsidprotein (CA), Nukleokapsidprotein (NC)
pol	Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) Protease (PR)
env	Oberflächenprotein (SU), Transmembranprotein (TM)

Tabelle 1-2: Retrovirale Strukturgene und die Proteinprodukte

Diese Viren können sich amplifizieren und stellen durch mögliche Insertionsmutagenesen ein Risiko in Gentherapieversuchen dar. Komplexere Verpackungszelllinien exprimieren die gag/pol-Proteine und das env-Protein von unterschiedlichen Konstrukten (Abbildung 1.7). Dazu gehören GP+E86-Zellen (Markovitz et al., 1988) und PG13-Zellen. Dennoch wurden auch in diesen „Sicherheits-Verpackungszellen“ RCR detektiert (Chong und Vile, 1996).

Ein Grund dafür ist vermutlich, dass diese Verpackungszelllinien von murinen Fibroblasten abstammen. Die Zellen enthalten endogene murine Retrovirussequenzen. Sowohl die Helferfunktionen als auch die am häufigsten eingesetzten retroviralen Vektoren basieren ebenfalls auf dem Maus Leukämie Virus (MLV) (Miller und Buttimore, 1986; Markovitz et al., 1988; Danos und Mulligan, 1988; Miller and Rosman, 1989). Es kann also zu Rekombinationen zwischen endogenen Sequenzen und den transduzierten Elementen kommen, was zur Bildung von RCR führen kann. Die Sensitivität der produzierten Partikel gegenüber dem humanen Komplementsystem wirkt sich *in vivo* zusätzlich ungünstig auf

therapeutische Anwendungen aus (Takeuchi et al., 1994; Cosset et al., 1995; Ory et al., 1996; Rigg et al., 1996).

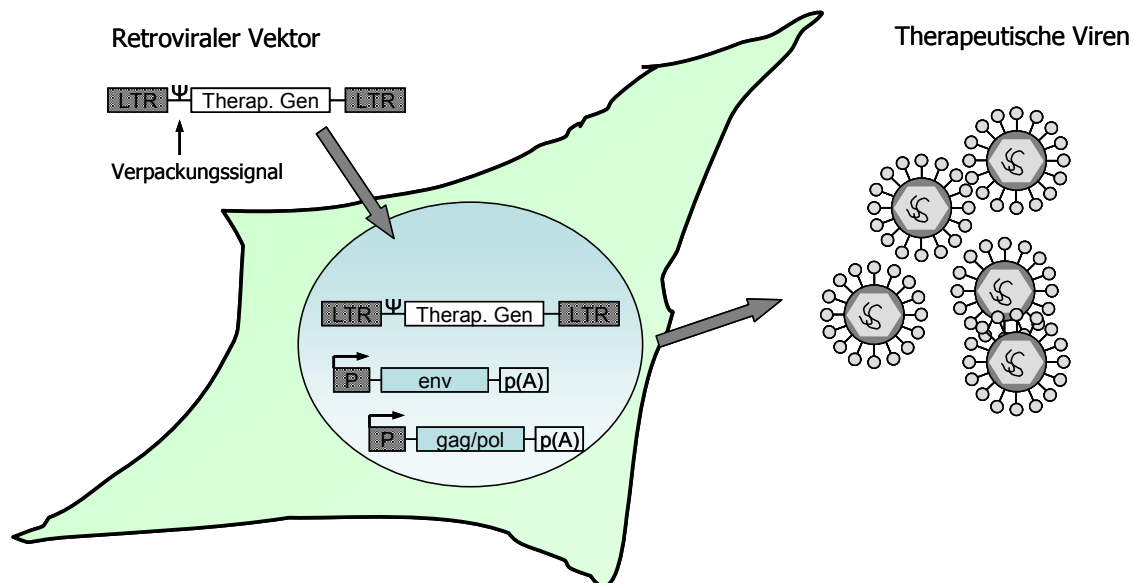


Abbildung 1.7: Herstellung therapeutischer Retroviren mit Verpackungszellen. Nach der Transduktion des retroviralen Vektors in die Zelle werden durch die *trans*-wirkenden Genprodukte der Helferfunktionen gag/pol und env infektiöse Partikel freigesetzt.

Für die Etablierung einer neuen Produzentenzelllinie wurden in dieser Arbeit daher humane HEK293-Zellen gewählt. Humane Zellen enthalten keine endogenen murinen retroviralen Sequenzen welche verpackt werden könnten (Rigg et al., 1996; Torrent et al., 1994). Die Fähigkeit RCR zu bilden sollte somit reduziert sein. Ein weiterer Vorteil von HEK293-Zellen liegt in den möglichen Produktionsbedingungen. Murine Verpackungszelllinien wachsen strikt adhärent, können also nur in Oberflächenkultursystemen wie Flaschen oder Festbettreaktoren kultiviert werden. HEK293-Zellen hingegen lassen sich serumfrei in Suspension halten und so zu hohen Zelldichten führen (Merten, 2004).

1.3.2 Vektorsysteme

Die am häufigsten verwendeten Retroviren für die Gentherapie basieren auf dem Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV). Diese Viren haben sich durch den Gentransfer von Fremdgenen in verschiedene Zelltypen als erfolgreiches therapeutisches Werkzeug erwiesen. Dennoch ist die Anwendung von MoMLVs für embryonalen Karzinomazellen und embryonalen Stammzellen beeinflusst durch die niedrige Expression in undifferenzierten Zellen (Vernet

und Cebrian, 1996). Grez et al. (1990) entdeckten bei der Analyse von Retrovirusmutanten MES-Viren (Mausembryo Stammzellvirus). Diese zeigten gute Expressionseigenschaften in (undifferenzierten) embryonalen Stammzellen (ES). Sie unterscheiden sich in drei Merkmalen von MLV. 1) Sie besitzen eine hochaffine Bindungsstelle für den Sp1 Transkriptionsfaktor; 2) Sie haben keine Bindungsstelle mehr für das embryonale LTR-Bindungsprotein, welches als transkriptioneller Repressor fungiert (Tsukiyama et al., 1989); 3) Das negativ regulatorische Element (NRE) wurde eliminiert (Loh et al., 1990). Der retrovirale Vektor MSCV (murines Stammzellvirus) wurde von dieser Mutante abgeleitet und verfügt über ein erweitertes Verpackungssignal welches hohe Titer garantieren soll (Miller und Rosman; 1989).

Zusätzlich wurde die gesamte env-Sequenz eliminiert, was die Möglichkeit der Generierung von replikationskompetenten Retroviren (RCR) minimiert und so die Sicherheit für den Einsatz in der Gentherapie erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich ein sogenannter SIN (*self inactivating*)-retroviraler Vektor verwendet. Die Entfernung des Enhancers der U3-Region des 3' LTR führt nach reverser Transkription zur Inaktivierung des viralen 5' LTR. Einflüsse des viralen Promotors/Enhancers auf die genomische Umgebung aber auch auf interne Promotoren können so ausgeschlossen werden (Blesch, 2003). Der Einsatz von SIN-Vektoren in der Gentherapie ist eine Alternative zu konventionellen MLV basierenden Viren (Barquinero et al., 2004).

1.4 Aufgabenstellung

Die Produktion rekombinanter Proteine für Forschung und klinische Anwendungen ist eine der wichtigsten Aufgaben der modernen Biotechnologie. Obwohl die Systeme für die Produktionsprozesse und die Aufarbeitung der Proteine ständig verbessert wurden, existiert noch immer keine generelle Strategie zur Etablierung der Produzentenzellen. Häufig werden die Expressionsvektoren in die Wirtszellen transduziert und in einem aufwendigen Screeningprozess geeignete Klone isoliert. Die Transduktionsmethode und die Art der Vektorintegration beeinflussen maßgeblich die Stabilität und die Höhe der Produktivität. Können diese Eigenschaften nicht in genügendem Maße erreicht werden, entstehen Probleme in der Ausbeute, der Kostenstruktur des Prozesses und schließlich auch in der Zulassung des Produktes. Dies ist insbesondere für die Produktion von retroviralen Vektoren für gentherapeutische Zwecke wichtig.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Strategie zur Etablierung von neuen, flexiblen Produzentenzellen mit einer vorhersagbaren Expression. Verhoeven et al. (2001)

konstruierten einen retroviralen Vektor zum Markieren von chromosomalen Loci in Wirtszellen. Der Aufbau des Vektors ermöglichte einen späteren Austausch der retroviralen Kasette gegen eine neue Expressionskasette. Darauf aufbauend sollte ein System entwickelt werden, mit welchem hochexprimierende Loci in verschiedenen Zelllinien markiert und analysiert werden können. Anschließend sollten diese Klone einem Kassettenaustausch mit verschiedenen Vektoren unterzogen werden. Die ausgetauschten Klone sollten hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens charakterisiert werden um die Frage beantworten zu können, ob sich die Kassettenaustauschstrategie für die Etablierung von industriell nutzbaren Produktionszellen eignet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen retroviralen Verpackungszelllinie auf der Basis der Kassettenaustauschsystems. Im Gegensatz zu den bereits erhältlichen Verpackungszellen sollte zunächst ein hochexprimierender Integrationsort für den retroviralen Vektor gefunden werden. Erst im zweiten Schritt erfolgten die Transduktion der viralen Helferfunktionen und die anschließende Selektion von hochtitrigen Produzentenzellen. Diese Reihenfolge sollte ein gezieltes „Screening“ nach geeigneten Klonen erlauben, basierend auf einem optimalen Zusammenspiel der drei Komponenten: Viraler Vektor, gag/pol und env. Unterschiedliche retrovirale Austauschvektoren sollten entwickelt und in den Integrationsort einer stabilen Zelllinie integriert werden. Die Ergebnisse des Kassettenaustauschs und der Produktivitäten der ausgetauschten Klone sollen helfen, Konstruktionsprinzipien für therapeutische Austauschvektoren zu entwickeln.

2 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Systems zur Etablierung von flexiblen Produzentenzellen. Unter Verwendung des Rekombinase vermittelten Kassettenaustauschs (RMCE) werden verschiedene Expressionskassetten in definierte chromosomale Loci verschiedener biotechnologisch relevanter Zelllinien integriert. Dieser Prozess beinhaltet zwei aufeinander folgende Schritte: 1) Die Markierung des Locus mit einem Reportergen und die Bestimmung chromosomaler Einflüsse auf dessen Expression und 2) Den Austausch dieses Reporters gegen eine neue Expressionskassette. Da die umliegenden chromosomalen Sequenzen dieser Kassette nicht verändert werden, sollte diese Strategie eine vorhersagbare Expression gewährleisten. Dies würde den intensiven Isolationsprozess von rekombinanten Säugerzellen mit geeigneten Expressionslevel reduzieren.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse sollen die Fragestellungen beantwortet werden, ob mit diesem System a) Zellen für die Proteinproduktion und b) retrovirale Helferzellen generiert werden können.

2.1 Die Strategie

Der erste Schritt zur Etablierung der neuen Produzentenzellen ist die Markierung von chromosomalen Loci. Retroviren stellen dafür das geeignete Werkzeug dar. Mit Hilfe von retroviralen Vektoren ist es möglich Einzelintegrate des Markierungsvektors zu generieren (Dies ist mit anderen Gentransfermethoden nur schwer zu gewährleisten.). Retrovirale Integrationsstellen befinden sich häufig in Regionen mit erhöhtem transkriptionellen Potential. Zusätzlich integriert nur das definierte Provirus in das Genom, frei von unerwünschten prokaryotischen Sequenzen, welche mit der Transgenexpression interferieren könnten. Der hier verwendete MSCV-Vektor (vgl. Kap. 1.3.2) zeichnet sich durch hohe Titer und LTR-gesteuerte Transgenexpression auch in ES-Zellen aus.

Für die gezielte Integration von Expressionskassetten in den markierten Locus wurde das FRT/Flp-Rekombinationssystem verwendet. Die notwendigen Erkennungsstellen (FRT) dieses Systems wurden in den 3' LTR eines retroviralen Vektors integriert (Abbildung 2.1 A). Dieser wird nach Infektion dupliziert zum 5' LTR, sodass die provirale Sequenz von den Erkennungsstellen flankiert ist und durch eine neue Expressionskassette ausgetauscht

werden kann. Um die Austauscheffizienz zu maximieren, wurden zwei heterologe FRT-Sequenzen verwendet, die sowohl das Provirus als auch den Austauschvektor flankieren und nur mit gleichen Sequenzen rekombinieren können. Zusätzlich wurde das Provirus mit einem deletierten Neomycinresistenzgen („Selektionsfalle“) ausgestattet, welches nur durch korrekten Kassettenaustausch komplettiert und aktiviert werden kann (vgl. Kap. 1.2.2).

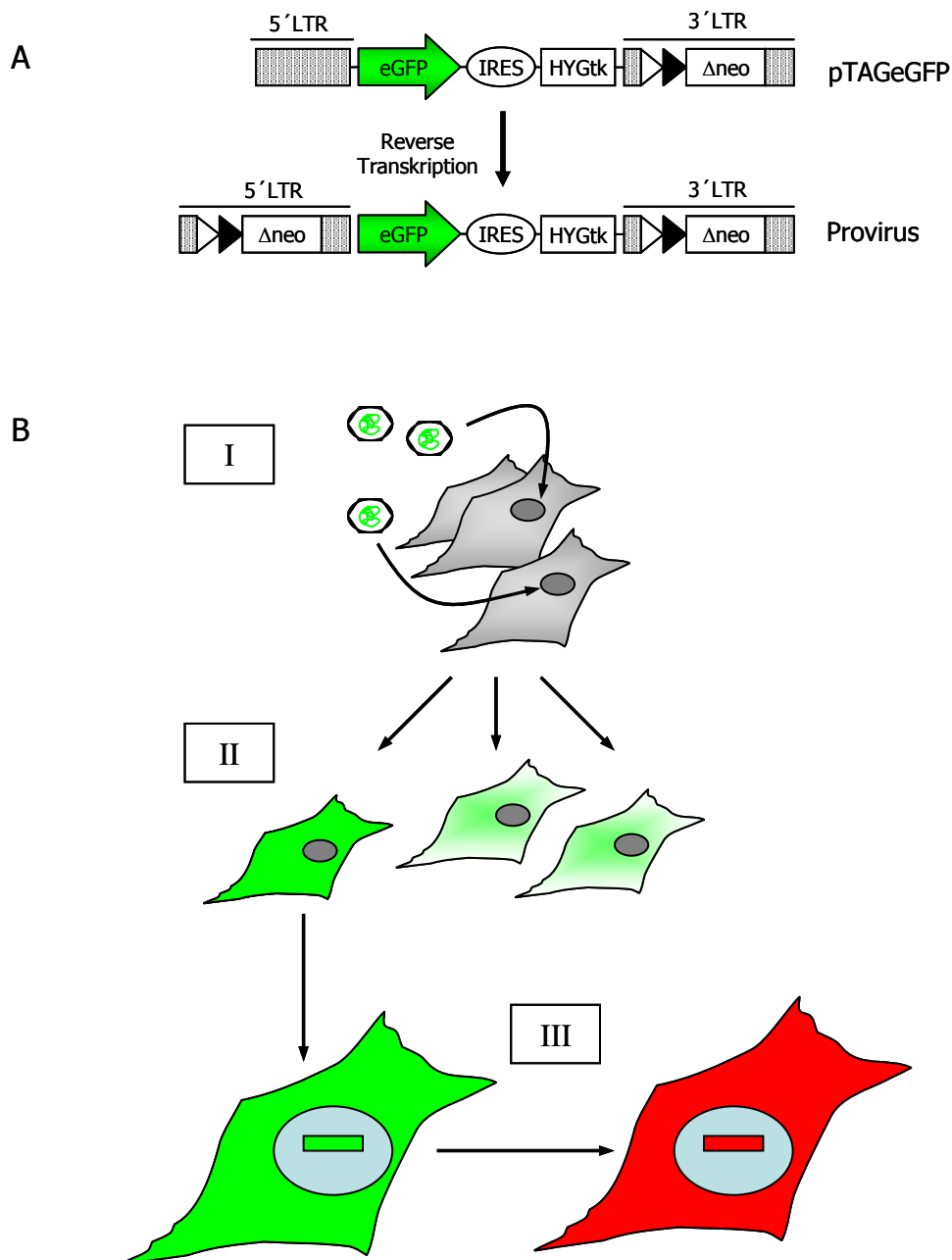


Abbildung 2.1: Strategie zur Etablierung von Produzentenzellen. **A:** Schematische Darstellung des Markierungsvektors pTAGeGFP und des integrierten Provirus. (weiße/schwarze Dreiecke: heterologe FRT-Sequenzen F1 und F5) **B:** Schema der Klonierung **I:** Infektion der Zielzellen mit pTAGeGFP. **II:** Sortierung der eGFP-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie und Isolierung der Höchstexprimierer. **III:** Sequenzspezifische Rekombination (RMCE), Austausch gegen eine neue Expressionskassette in den markierten Locus.

Die Strategie zur Etablierung geeigneter Produktionszelllinien ist in der Abbildung 2.1 B dargestellt.

Für die retrovirale Markierung von Mausfibroblasten entwickelten Verhoeven et al. (2001) einen Markierungsvektor, welcher für das Reportergen β -Galaktosidase kodiert. Dieses Reportergen eignet sich allerdings nicht für eine effiziente Suche nach hochexprimierenden Integrationsorten, da alle markierten Klone aufwendig in Aktivitätsassays auf ihre Reportergenexpression hin verglichen werden müssen. Zudem ist es mit diesem Reporter nicht (oder nur bedingt) möglich, mittels Durchflusszytometrie (FACS) hochexprimierende Zellen zu sortieren und zu selektieren. Abgeleitet von dem ursprünglichen Vektor von Verhoeven et al. wurde daher der Markierungsvektor pTAGeGFP kloniert (Abbildung 2.1 A). Der MSCV-basierende Vektor kodiert für das „*enhanced green fluorescence protein*“ (eGFP). Die GFP-Expression infizierter Zellen ermöglicht die Untersuchung des Einflusses der chromosomalen Umgebung auf die Transgenexpression, aber auch die einfache Anreicherung und Isolierung von transkriptionell hoch aktiven Klonen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Weiterhin enthält der Vektor ein Fusionsgen aus Hygromycinphosphotransferase und Thymidinkinase (hyg^{tk}), beide gesteuert durch den retroviralen 5' LTR Promotor, bzw. ein EMCV-IRES-Element (*encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site*). Infizierte, das heißt markierte Zellen sind somit hygromycinresistent und können mit Hygromycin selektiert werden.

Entsprechend der Abbildung 2.1 B geschieht die Markierung der chromosomalen Loci in den Zielzellen durch retrovirale Infektion (I). Zu diesem Zweck wird pTAGeGFP in Verpackungszellen transfiziert, welche daraufhin infektiöse Retroviren produzieren. Die Infektion erfolgt unter Bedingungen, welche eine Einzelintegration des Provirus bevorzugen sollen (vgl. Kap. 4.7.8). Anschließend erfolgt die Selektion der infizierten Zellen mit Hygromycin. Die resistenten Zellen werden mittels Durchflusszytometrie nach der Höhe der GFP-Expression sortiert und die höchstexprimierenden Zellen werden isoliert (II).

Im dritten Schritt kann die retrovirale Reporterkassette gegen eine beliebige neue Expressionskassette ausgetauscht werden (III). Der Kassettenaustausch wird durch das FRT/Flp-Rekombinationssystem ermöglicht. Die für die Rekombination notwendigen Erkennungssequenzen (FRT-Sequenzen) flankieren das Provirus. Die ausgetauschten Klone werden im Folgenden als Subklone bezeichnet.

2.2 Markierung und Isolierung von hochexprimierenden chromosomalen Loci in verschiedenen Zelllinien

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das RMCE-System zu isogenen Subklonen mit vorhersagbaren Expressionen führen kann (Verhoeyen et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob mit Hilfe dieser Strategie Zellen mit vorhersagbaren, optimalen Produktionseigenschaften hergestellt werden können. Ausgewählt wurden die Hamsterzelllinien CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) und BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) und die humane Zelllinie HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). Diese Zellen werden bevorzugt in der biotechnologischen Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt (vgl. Kap. 1)

2.2.1 Produktion von pTAGeGFP Markerviren zum Auffinden hochexprimierender Loci

Um möglichst optimale Bedingungen für die retrovirale Markierung zu ermitteln, wurde zunächst untersucht über welchen Rezeptor die Zellen effizient infiziert werden können. Dazu wurde der Vektor pTAGeGFP in die etablierten Verpackungszelllinien PA317, PG13, PT67 und Ψ 2 transfiziert. Die von diesen Verpackungszelllinien freigesetzten Retroviren unterscheiden sich in den env-Proteinen und erkennen unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Tabelle 2-1). Nicht-murine Zellen können über die Pit-1 oder Pit-2 Rezeptoren infiziert werden. Dennoch ist die Transduktion und stabile Integration von Fremdgenen in Hamsterzellen mittels Retroviren durch die geringe Infizierbarkeit eingeschränkt. Ein von Karreman C. et al. (1996) entdeckter Klon der BHK-21 Zelllinie (BHK-A) stellt einen Sonderfall dar, da gezeigt werden konnte, dass eine Infektion über den mCat-1 Rezeptor möglich ist. Dieser Klon wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

Die transfizierten Zelllinien wurden mit Hygromycin selektiert und anschließend wurde der retrovirale Titer auf NIH3T3 (PA317, PT67, Ψ 2) beziehungsweise HEK293-Zellen (PG13) bestimmt. Die ermittelten Werte für die Titer lagen zwischen $1 \cdot 10^5$ infektiöse Partikel (iP)/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h (PT67) und $1,7 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h (Ψ 2). Um zu testen welche der Viren die eingesetzten Zellen am besten infizieren, wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ BHK-21, CHO-K1 und HEK293-Zellen ausgesät und mit einer MOI von 0,01 infiziert (vgl. Kap. 4.7.8). Anschließend wurden die infizierten Zellen durchflusszytometrisch auf die Anzahl der GFP-

positiven hin analysiert. Die Auswertung dieser Analyse ist in der Tabelle 2-1 gezeigt. Erwartungsgemäß konnten von PG13 und PT67 produzierte Partikel sowohl HEK293 als auch CHO-Zellen infizieren, während BHK-Zellen ausschließlich mit Ψ 2-Überständen, das heißt über den ecotropen Rezeptor mCat-1 infiziert wurden. Der Vergleich der Zelllinien zeigte weiterhin, dass die Infektion der HEK293-Zellen effizienter verlief als die von BHK-21 und CHO-K1. So konnten unter gleichen Bedingungen mit den unterschiedlichen Viren zwischen 10 und 20% infizierter HEK293-Zellen gemessen werden, während nur etwa 3% der Hamsterzellen im FACS GFP-positiv waren. Im Folgenden wurden daher sowohl HEK293 als auch CHO-Zellen mit PG13 produzierten Viren infiziert, während für die BHK-Zellen Ψ 2-Viren verwendet wurden.

	Titer [iP/1·10 ⁶ Zellen·24h]	Rezeptor	HEK293	BHK-21	CHO-K1
<i>PG13*</i>	1,0·10 ⁶	Glv-1 (Pit-1)	+++	-	+
<i>PT67</i>	1,0·10 ⁵	Glv-1 (Pit-1) Ram-1 (Pit-2)	++	-	+
<i>PA317</i>	1,6·10 ⁵	Ram-1 (Pit-2)	+	-	-
<i>Ψ2</i>	1,7·10 ⁶	mCat1	-	+	-

Tabelle 2-1: Effizienz der Infektion von HEK293, BHK-21 und CHO-K1-Zellen mit Virusüberstand verschiedener Verpackungszellen. : Retroviraler Titer verschiedener transfizierter Verpackungszelllinien nach Transfektion mit pTAGeGFP und Hygromycinselektion. Die Titer wurden auf NIH3T3-Zellen bestimmt. *Da Viren aus PG13 nicht mausinfizierend sind, wurden HEK293-Zellen für die Titerbestimmung eingesetzt. (+ = 1-5%; ++ = 5-10%; +++ = 10-20% infizierte Zellen)

2.2.2 Langzeitstabilität der infizierten Zellen

Ein essentielles Kriterium für eine technisch verwendbare Zelllinie ist die Langzeitstabilität der Transgenexpression. Für die Untersuchung, ob und in wieweit die Zelllinien eine Langzeitstabilität unterstützen, wurden die mit pTAGeGFP infizierten HEK293, BHK-21 und CHO-K1-Zellpopulationen mit Hygromycin selektiert, nach etwa zwei Wochen gesplittet und für 20 Passagen mit, beziehungsweise ohne Selektionsdruck inkubiert. Anschließend wurden beide Populationen jeder Zelllinie wieder im FACS vermessen (Abbildung 2.2). Die eGFP-Expression in HEK293-Zellen blieb über den gesamten Zeitraum des Experimentes auch ohne

Selektionsdruck stabil. Dies ist an den beiden übereinander liegenden Fluoreszenzsignalen zu erkennen. Ein solches Expressionsprofil kann bedeuten, dass alle infizierten Zellen (unterschiedliche Integrationsorte) ohne Selektionsdruck stabil blieben. Es ist aber auch möglich, dass die Heterogenität der Population während des Experiments verloren ging und nur ein oder wenige stabile Klon(e) durchwachsen konnten.

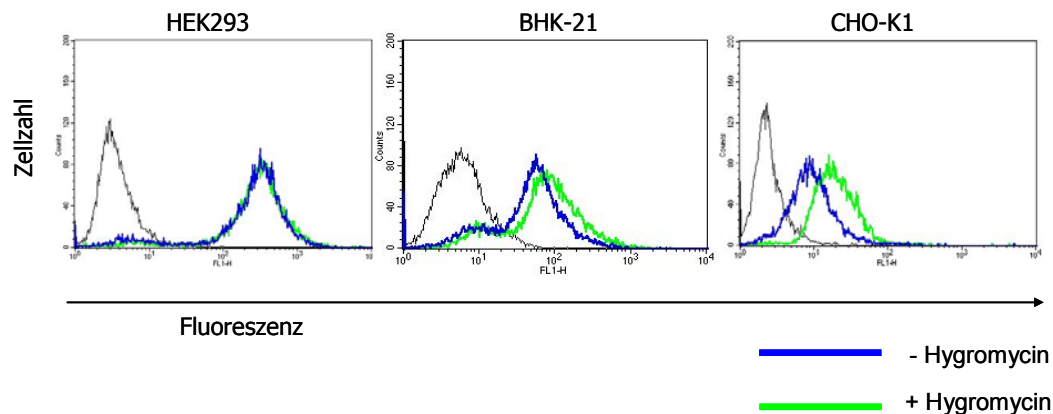


Abbildung 2.2: Langzeitstabilität der mit pTAGeGFP-Retroviren infizierten HEK293, BHK-21 und CHO-K1 Zellen. Die infizierten Zellpopulationen wurden über einen Zeitraum von 20 Passagen mit und ohne Selektionsdruck von Hygromycin kultiviert und anschließend im FACS vermessen (dunkle Linie: Populationen ohne Selektionsdruck, helle Linie: Populationen mit Selektionsdruck).

Die Population der infizierten BHK-21 Zellen wies eine schwache Verschiebung des „Peaks“ im FACS-Profil auf, wenn die Zellen ohne Hygromycin kultiviert wurden (dunkle Linie). Auch hier könnte es sich, analog zu den infizierten HEK293-Zellen, um ein stabiles Gemisch oder einen einzigen Klon handeln.

Im Gegensatz zu den HEK293 und BHK-Zellen war eine deutliche Abnahme der Reportergenexpression im Falle der markierten CHO-K1-Zellpopulation zu beobachten. Hier verschob sich das Fluoreszenzsignal der Zellen ohne Selektionsdruck um etwa eine halbe log-Stufe. Dieses Ergebnis beinhaltet die Möglichkeit, dass alle Zellen im gleichen Maße weniger GFP exprimieren, wenn sie ohne Selektionsdruck kultiviert werden. Es ist daher notwendig zu klären, aus wie vielen unterschiedlich markierten Loci, also aus wie vielen Klonen die Population besteht. Wenn auch die GFP-Expression einer Population absinkt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Klone in ihren Expressionseigenschaften stabil sind, aber von anderen Zellen überwachsen werden. Aus diesem Grund wurden von allen drei Zelllinien Klone isoliert und für weitere Untersuchungen eingesetzt.

2.2.3 Isolierung und Charakterisierung von hochexprimierenden Klonen

Nach Infektion und Hygromycinselektion der Zelllinien BHK-21, CHO-K1 und HEK293 wurde die GFP-Expression benutzt, um stark exprimierende Zellen mittels FACS anzureichern. Ziel der Sortierung war die Isolierung von Zellen mit markierten, hoch exprimierenden chromosomalen Loci aus einem breiten Spektrum zufällig markierter Zellen.

Aus dem infizierten Zellgemisch einer jeden Zelllinie wurden die 20% der höchsten GFP-exprimierenden Zellen herausortiert. In einem zweiten Sortierschritt wurden dann wiederum die höchstexprimierenden 20% der markierten Zellen aus dieser Population selektiert und gleichzeitig vereinzelt. Als Beispiel ist hier die Anreicherung von HEK293-Zellen gezeigt (Abbildung 2.3). Durch die Infektion und Selektion mit Hygromycin wurde eine erste Population von etwa 50.000 zufällig markierten Klonen generiert. Nach dem ersten Sortierschritt wurde die mittlere Fluoreszenz um etwa eine halbe log-Stufe angehoben. Aus dieser Population wurden die Klone mit erhöhter GFP-Expression isoliert. Weitere Sortierschritte brachten keine weitere Erhöhung des Fluoreszenzsignals, sodass die Anreicherung von hochexprimierenden Zellen auf 2 Schritte beschränkt werden konnte.

Die sortierten Klone wurden hinsichtlich der Stabilität der GFP-Expression über 50 Passagen getestet. Als Beispiel ist in der Abbildung 2.3 B der Langzeitstabilitätstest des HEK293-Klons 1B2 dargestellt.

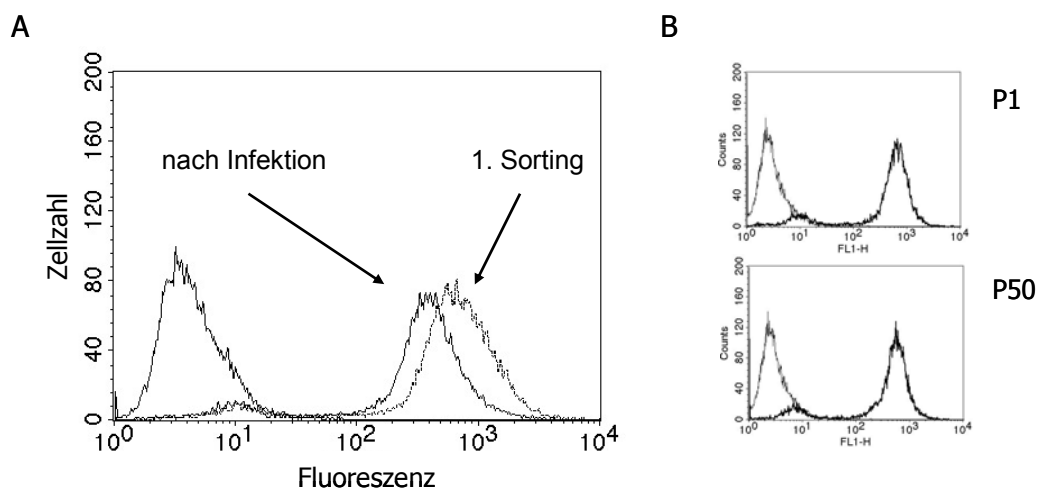


Abbildung 2.3: FACS-Profil von infizierten und sortierten HEK293-Zellen. A: Die Zellen wurden im Anschluss an die Infektion mit Hygromycin selektiert. Im ersten FACS-Schritt wurden die 20% mit der höchsten GFP-Expression aussortiert. Diese neue Population bildete die Grundlage für die zweite Sortierung, in der die Einzelzellen isoliert wurden. Auch hier wurden nochmals die 20% der Zellen mit der höchsten GFP-Expression ausgewählt. B: Langzeitstabilität des HEK293-Klons 1B2 nach zweitem Einzelzell-Sortierschritt und Kultivierung ohne Selektionsdruck für 50 Passagen (unteres Bild nach 50 Passagen).

Insgesamt wurden 48 HEK293-Klone auf Stabilität der Transgenexpression überprüft. Keiner zeigte einen Expressionsverlust. Ebenso stabil waren auch alle 25 isolierten BHK-21-Klone. Im Falle der selektierten CHO-K1-Klone ergab sich ein differenziertes Bild. Die Hälfte der im Rahmen dieser Arbeit analysierten 65 Klone wies einen Verlust an GFP-Expression auf, während die übrigen stabil blieben.

Für den Kassettenaustausch ist es Voraussetzung, dass nur eine provirale Kopie des Markierungsvektors im Genom der Zielzelle integriert ist. Die Überprüfung der Kopienzahlen des Markierungsvektors in den isolierten Klonen aller 3 Zelllinien erfolgte durch die Detektion von Randfragmenten nach dem Southern Blot Verfahren. Die mit *SacI* verdauete zelluläre DNA wurde auf eine Membran transferiert.

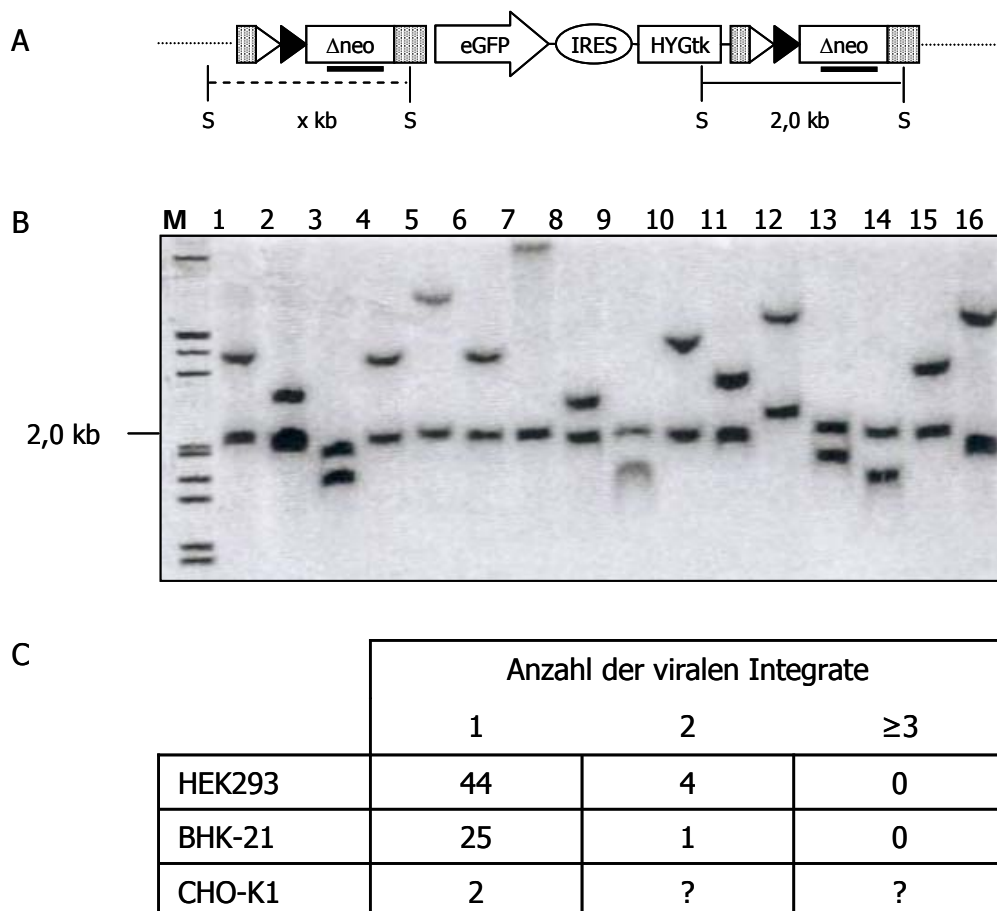


Abbildung 2.4: Nachweis der integrierten Kopien des Vektors pTAGeGFP im Genom von sortierten HEK293-Klonen. A: Schematische Darstellung des Provirus mit den *SacI*-Restriktionsstellen. Der schwarze Balken markiert das Fragment des Neomycinresistenzgens, welches als Sonde verwendet wurde. B: Die genomische DNA von 16 Klonen wurde *SacI* verdaut und mit einer *neo*-Sonde hybridisiert. Die erwarteten Bandengrößen bei viraler Einzelkopie sind 2,0 kb und x kb in Abhängigkeit von der Integrationsstelle. S = *SacI*-Restriktionsstelle, M = Marker. C: Zusammenfassung der Southern Blot Analyse der isolierten Parentalklone aller 3 Zelllinien.

Anschließend wurde ein radioaktiv markiertes 568 bp großes Fragment aus dem Neomycinresistenzgen zur Hybridisierung verwendet. Eine Einfachkopie des Vektors pTAGEGFP resultiert in einem 2,0 kb Fragment und einem Fragment unbekannter Größe, welche abhängig vom Locus der Virusintegration ist (vgl. Abbildung 2.4 A). Die in der Abbildung 2.4 B gezeigten 16 HEK293-Klone haben demnach nur eine Viruskopie erhalten. Von insgesamt 48 analysierten HEK293-Klonen wiesen nur 4 eine weitere provirale Kopie auf. Für die infizierten BHK-21-Zellklone wurde in nur einem von 25 selektierten Klonen eine zweite Kopie nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Daten sind in der Tabelle der Abbildung 2.4 C zusammengefasst. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Infektionsbedingungen einen hohen Anteil an Einzelintegraten lieferten und die in Kap. 2.2.2 beschriebenen Expressionsprofile auf unterschiedliche stabile Klone zurückzuführen sind. Die Analyse der isolierten CHO-K1-Klone soll im folgenden Kapitel gesondert behandelt werden.

2.2.4 Die vorgestellte Strategie führt zu einer geringen Diversität der isolierten CHO-K1-Klone

In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden CHO-K1-Zellen infiziert, mit Hygromycin selektiert und mittels Durchflusszytometrie sortiert. Überraschenderweise zeigte stets ein Großteil der Klone eines Experiments identische Bandenmuster in der Southern Blot Analyse. Ein Beispiel für ein solches Ergebnis ist in der Abbildung 2.5 A wiedergegeben. 7 der gezeigten 8 Klone zeigen 3 Banden gleicher Laufhöhe. Dieses Bandenmuster weist auf zwei Integrationsstellen des retroviralen Vektors in stets dieselben chromosomalen Loci hin. Da dies aber höchst unwahrscheinlich ist, kann geschlussfolgert werden, dass, bedingt durch Wachstumsvorteile, nur wenige Klone durchwachsen konnten und so mehrfach isoliert wurden. Nur der Klon 6 (Pfeil) zeigt als Resultat einer Einzelkopie das erwartete Bandenmuster (vgl. Abbildung 2.4).

Um eine größere Auswahl an markierten Klonen mit einer höheren Diversität zu erhalten, wurden in einem weiteren Experiment die Zellen direkt nach der Infektion einer Einzelzellsortierung unterzogen. Dies sollte ausschließen, dass die Hygromycinselektion und die folgenden Sortierschritte eine Selektion von nur wenigen schnell wachsenden Klonen begünstigen. Doch auch diese Experimentanordnung brachte keine Verbesserung der retroviralen Markierung, beziehungsweise der genetischen Diversität.

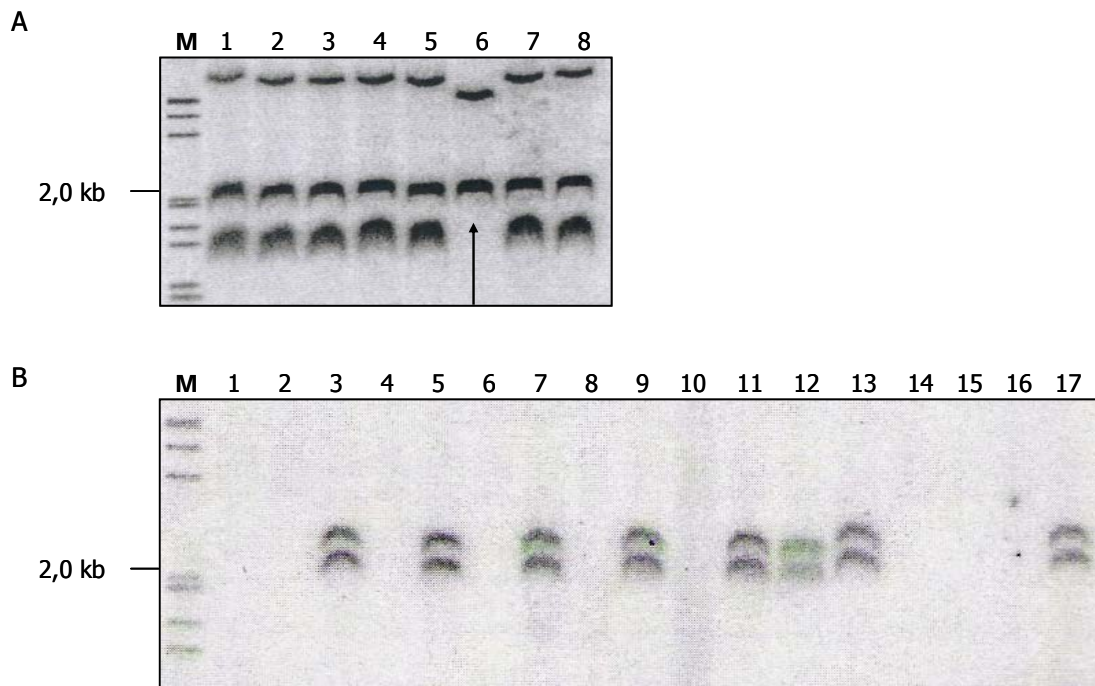


Abbildung 2.5: Southern Blot Analyse von CHO Klonen. A: Die genomische DNA von 8 Klonen wurde *SacI* verdaut und gegen das Neomycinresistenzgen hybridisiert. Der Pfeil markiert den Klon, der für weitere Experimente verwendet wurde. B: Analyse von 17 Klonen aus einem unabhängigen Experiment. 9 der aufgetragenen Klone zeigen kein Signal nach der Hybridisierung gegen das Neomycinresistenzgen, während es sich bei den übrigen wahrscheinlich um denselben Integrationsort handelt.

Eine weitere Beobachtung der Southern Blot Analyse war der Sequenzverlust des proviralen Konstruktes, der offenbar in einigen Klonen nach der Infektion auftrat. Die Abbildung 2.5 B zeigt einen Southern Blot von CHO-K1-Klonen, welche direkt nach der Infektion ohne Hygromycinselektion sortiert wurden. In 9 von 17 aufgetragenen Klonen konnte kein Neomycinresistenzgen detektiert werden. Obwohl der DNA Gehalt der aufgetragenen Proben identisch war, fehlt in diesen Klonen das erwartete Signal. Somit kann man davon ausgehen, dass die neo-Sonde nicht binden konnte. Da diese Klone aber aufgrund ihrer GFP-Expression vereinzelt wurden, sind zumindest Teile des Vektors integriert. Die „neo-positiven“ Klone weisen als Zeichen eines zwar identischen, aber zumindest singulären Integrationsortes das erwartete Bandenmuster auf. Auch hier handelt es sich offenbar immer um denselben Klon, welcher mehrfach isoliert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der vorgestellte Prozess zur retroviralen Markierung in CHO-K1-Zellen zu einer geringen Diversität führt. Die geringe Infektionseffizienz (vgl. 2.2.1) und zellspezifische Besonderheiten führten dazu, dass in unabhängigen Experimenten nur wenige Klone durchwachsen konnten und so mehrmalig isoliert wurden. Zusätzlich

integrierten in einigen Klonen nur Teile des retroviralen Vektors. Nur Klon 6 (Abbildung 2.5 A) wurde für die Austauschexperimente verwendet.

2.2.5 Uniforme Expression der isogenen BHK-21 und HEK293-Subklone nach Kassettenaustausch

Die mit einer Einzelkopie des Vektors pTAGEGFP markierten Klone von BHK-21, CHO-K1 und HEK293-Zellen wurden hinsichtlich der Effizienz des Kassettenaustausches überprüft. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pTAREMCV verwendet (Verhoeyen et al., 2001). Er basiert wie der Markierungsvektor auf dem LTR des murinen Stammzellvirus (MSCV) und kodiert für das β -Galaktosidasegen. Die Transkription dieses Reportergens wird durch den retroviralen LTR gesteuert. Der Vektor enthält ebenfalls die beiden FRT-Sequenzen F1 und F5. Diese flankieren die Expressionskassette. Der Kassettenaustausch findet zwischen gleichen FRT-Sequenzen statt, von welchen eine im Provirus und das jeweilige Gegenstück auf dem Austauschplasmid lokalisiert sind. Da die FRT-Sequenzen die gleiche Orientierung haben, wird das provirale Konstrukt gegen die Austausch-kassette getauscht. Ein IRES-Element und ein ATG-Startkodon stellen nach dem Kassettenaustausch die Transkription des nun komplettierten Neomycinresistenzgens sicher (Abbildung 2.6 A). Als repräsentatives Beispiel soll hier der Kassettenaustausch anhand des HEK293-Klons 3C2, der beiden BHK-21-Klone IIIA1 und IIIA2 sowie des CHO-Klons 6 gezeigt werden.

Nach der Transfektion von $5 \cdot 10^5$ Zellen mit dem Flp-Rekombinase kodierenden Vektor pSVFLPe und pTAREMCV und anschließender G418-Selektion konnten je nach Zelllinie zwischen 50 und 100 Subklone etabliert werden. Dies bedeutet, dass in 0,02% der Zellen das Neomycinresistenzgen durch den Kassettenaustausch aktiviert wurde. Die Zeit, welche für die Etablierung der Subklone nach der „Targetingtransfektion“ benötigt wurde, lag je nach Zelllinie zwischen 14 und 21 Tagen. Die Subklone wurden expandiert und auf ihr Expressionsverhalten sowie korrekten Austausch der Expressionskassette hin untersucht.

Zur Überprüfung des Kassettenaustauschs wurden die Integrationsorte der Subklone mittels Southern Blot Analyse überprüft. Die mit *SacI* verdaute genomische DNA wurde dazu mit einer Sonde gegen das Neomycinresistenzgen hybridisiert. Durch den Austausch der proviralen Expressionskassette gegen die des Austauschvektors wird ein Großteil des 5'LTRs und der darin enthaltenen Kopie des Neomycinresistenzgens exzidiert, gleichzeitig aber die zweite Kopie des Gens im 3'LTR aktiviert (vgl. Abbildung 1.5). Aus diesem Grund sollten die

Subklone im Gegensatz zum Parentalklon nur eine Bande mit einer definierten Größe von 3 kb aufweisen. In der Southern Blot Analyse der Abbildung 2.6 B sind beispielhaft sieben der isolierten HEK293-Subklone mit der errechneten Bande gezeigt, während der Ausgangsklon IIIC2 die beiden erwarteten Parentalbanden aufweist. Insgesamt wurden 30 Subklone der 3 Zelllinien analysiert. In allen konnte die errechnete 3 kb Bande nachgewiesen werden. Die Austauscheffizienz war somit 100%, unabhängig von der Zelllinie oder dem getesteten Integrationsort.

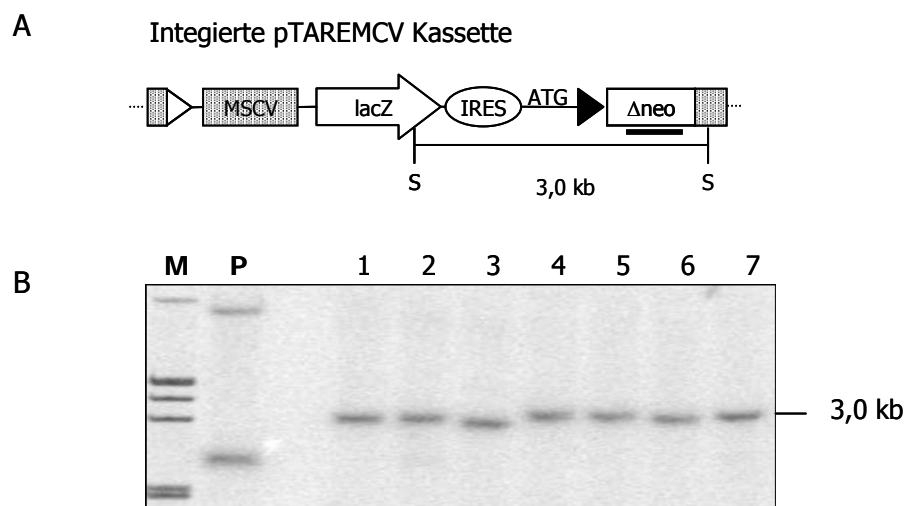


Abbildung 2.6: Evaluierung des Kassettenaustausches mit dem Austauschvektor pTAREMCV. **A:** Schematische Darstellung der integrierten Austausch-kassette im markierten Locus. **B:** Die genomische DNA von sieben repräsentativen Subklonen des HEK293-Parentalklons IIIC2 wurde *SacI* verdaut und gegen das Neomycinresistenzgen hybridisiert. Die erwartete Fragmentgröße ist 3,0 kb; M = Marker.

Weiterhin wurden die Subklone auf zufällige Integrationen des Vektors pTAREMCV getestet. Hierzu wurden die zuvor beschriebenen Southern Blots (Abbildung 2.6 B) wieder verwendet. Eine Sonde gegen das IRES-Element des Austauschvektors würde im Falle nichtspezifischer Integrationen zu zusätzlichen Signalen unbekannter Laufhöhe führen. Die Größe dieser Fragmente wäre dann abhängig vom Integrationsort. Die Analyse ergab allerdings, dass keine unspezifischen Integrationen des Austauschvektors vorlagen (Daten nicht gezeigt). Alle 30 Subklone wiesen ausschließlich die auch in diesem Fall zu erwartende 3 kb Bande auf.

Nachdem die korrekte Integration des Vektors gezeigt wurde, erfolgte eine Analyse der Subklone mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen nach dem Austausch GFP-negativ waren, die Markierungskassette somit eliminiert wurde (Abbildung 2.7 A). Die Expression von β -Galaktosidase wurde mittels einer Zellfärbung qualitativ bestimmt. Sowohl HEK293 als auch die BHK-21-Subklone wiesen eine homogene und

intensive Blaufärbung auf, was eine Expression des β -Galaktosidasegens in allen Zellen zeigt. In der Abbildung 2.7 B ist beispielhaft die Färbung des HEK293-Parentalklons IIIC2 und im rechten Teil eines Subklons nach dem Kassettenaustausch dargestellt.

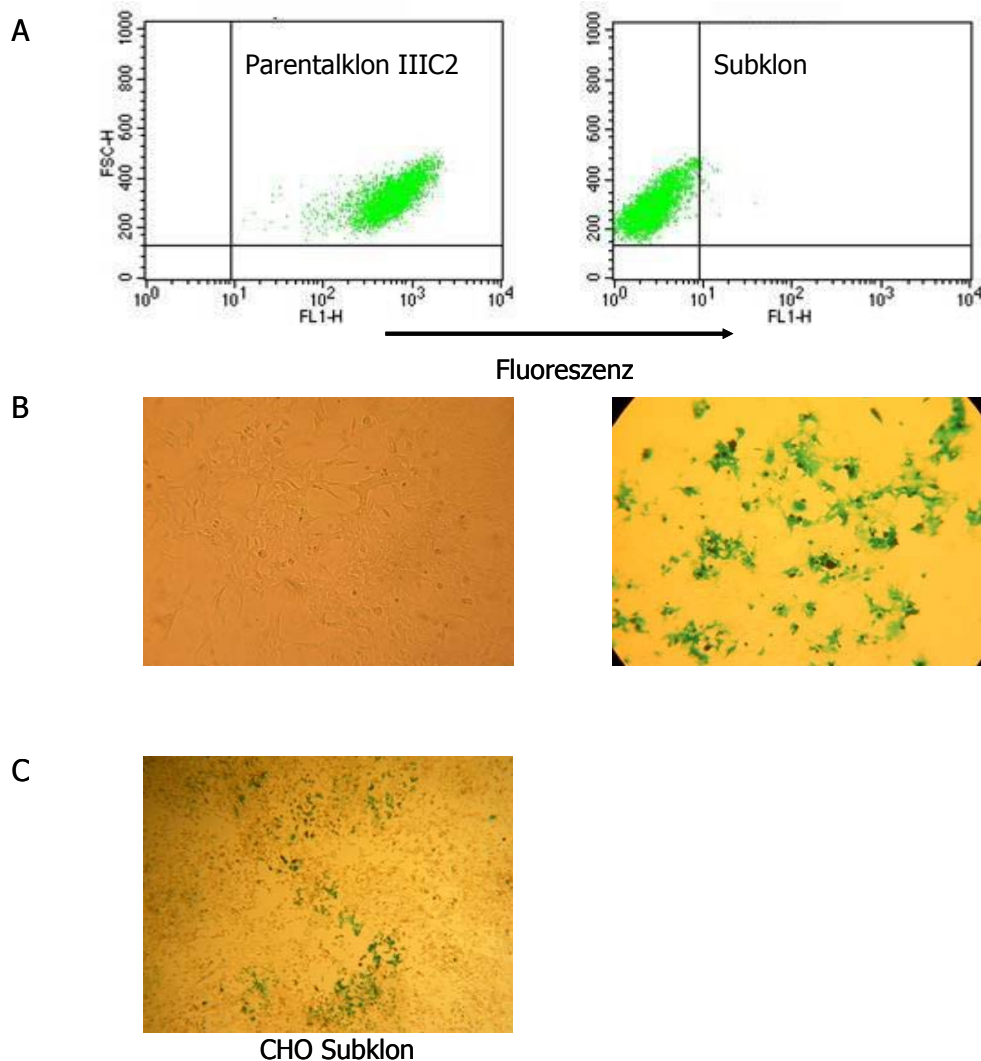


Abbildung 2.7: Expression der Reportergene vor und nach dem Kassettenaustausch mit pTAREMCV in repräsentativen Beispielen. Die dargestellten Färbungen ließen sich mit allen Klonen der Zelllinien BHK-21, HEK293 und CHO-K1 reproduzieren. A: FACS Profil des HEK293-Parentalklons IIIC2 und eines Subklons. B: β -Galaktosidase-Färbung von IIIC2 und eines Subklons. C: β -Galaktosidase Färbung eines CHO-K1-Subklons nach Kassettenaustausch.

Abweichend von diesen Ergebnissen wurde in allen 6 analysierten CHO-K1-Subklonen eine Mosaikexpression beobachtet. Das Expressionsmuster eines Subklons ist in Abbildung 2.7 C dargestellt. Deutlich zu erkennen sind blaue Zellen innerhalb großer Bereiche ohne Färbung. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass einige der Zellen die Expression der Reporterkassette abschalten. Zellspezifische Eigenschaften der CHO-K1-Zellen oder des

verwendeten Integrationsortes könnten demnach für den Unterschied im Expressionsverhalten zu den anderen beiden Zelllinien verantwortlich sein.

Nach der Überprüfung der Effizienz des Kassettenaustauschs und der qualitativen Analyse der β -Galaktosidaseexpression, wurde das Expressionsverhalten der neuen Reportergenkassette quantitativ überprüft. Das von dieser Kassette kodierte Enzym β -Galaktosidase erlaubt eine Messung der Enzymaktivität pro Zelle und somit eine Aussage über die Proteinexpression der Subklone.

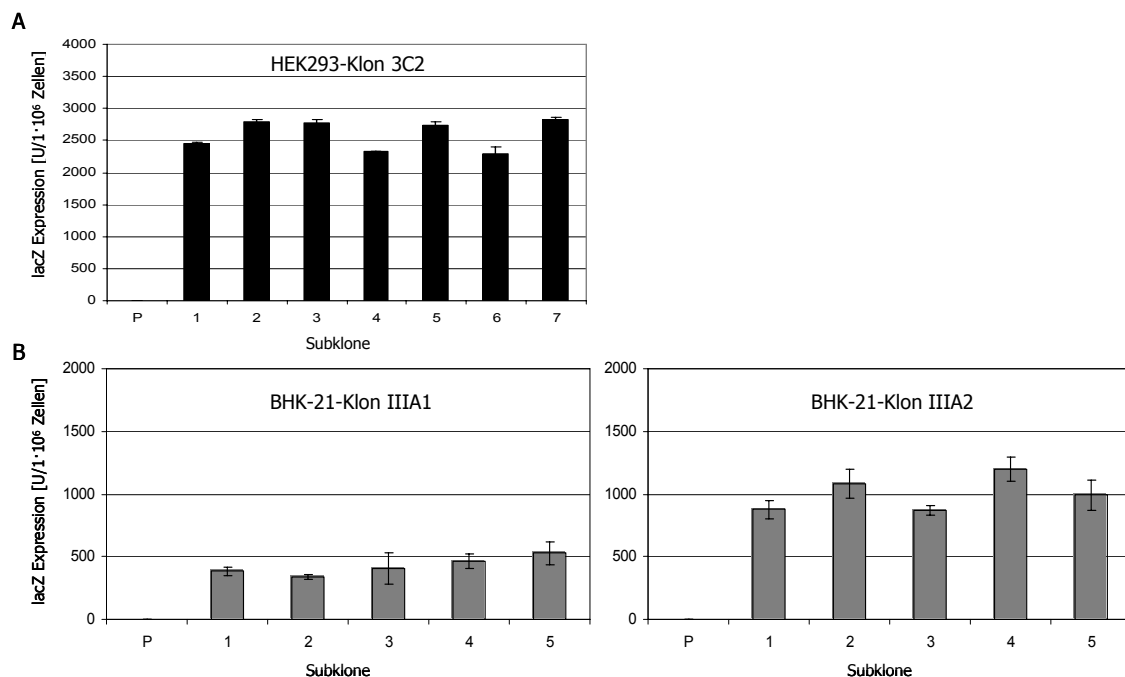


Abbildung 2.8: A: Quantifizierung der β -Galaktosidaseexpression von 7 HEK293-Subklonen des Integrationsortes 3C2. B: Quantifizierung der β -Galaktosidaseexpression von je 5 BHK-21-Subklonen der Parentalklone IIIA1 und IIIA2; P = Parentalklone.

Da die Subklone nach einer sequenzspezifischen Integration in den parentalen Locus genetisch untereinander identisch sind, konnte man ein übereinstimmendes Expressionsmuster erwarten. Während der mit dem Provirus markierte Parentalklon keine β -Galaktosidaseaktivität zeigt, produzieren die ausgetauschten Subklone vergleichbare Mengen des Enzyms. Im Falle der HEK293-Subklone konnte eine mittlere Aktivität von $2600 \text{ U/1} \cdot 10^6$ Zellen bestimmt werden (Abbildung 2.8 A). Die Abweichungen waren in der Tat gering und betrugen nur etwa $\pm 200 \text{ U}$ ($\pm 8\%$). Man kann also von einer uniformen Expression des Transgens in den isogenen Subklonen sprechen.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Subklone die nach der Integration von pTAREMCV in die BHK-21-Klone IIIA1 und IIIA2 etabliert wurden. Die gemessenen Aktivitäten waren untereinander

uniform, allerdings mit $420 \text{ U} \pm 66 \text{ U}/1 \cdot 10^6$ Zellen und $1000 \text{ U} \pm 125 \text{ U}/1 \cdot 10^6$ Zellen geringer als die der HEK293 Klon (Abbildung 2.8 B).

Da die CHO-K1-Subklone nach dem Kassettenaustausch mit pTAREMCV keine homogene β -Galaktosidaseaktivität, sondern eine Mosaikexpression zeigten, wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet. Die unregelmäßige Expression der Zellen kann keinen klaren Vergleich mit Subklonen der anderen Zelllinien zulassen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorgestellte Strategie zum erwarteten Ergebnis führt, der Kassettenaustausch also möglich ist. Die korrekte Integration der neuen Expressionskassette wurde in 100% der 30 analysierten Subklone nachgewiesen und eine zufällige Integration ausgeschlossen. Die isogenen Subklone konnten bereits 14-21 Tage nach der „*Targeting*“-Transfektion und G418-Selektion expandiert werden und zeigten eine homogene Expression des Reportergens β -Galaktosidase.

2.3 Die Produktion von rekombinanten Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit sollten unter Nutzung des Kassettenaustauschsystems Zelllinien für die Produktion von rekombinanten Proteinen etabliert werden. Als eine mögliche Anwendung wurde dafür die Expression von Antikörpern (AK) gewählt.

Forschungsergebnisse in der Technologie zur Entwicklung menschlicher Antikörper in transgenen Mäusen oder die Humanisierung von Mausantikörpern machten monoklonale AK (mAK) zu einem der wichtigsten Produkte der pharmazeutischen Industrie (Haurum und Bregenholt, 2005). Allerdings ist der Einsatz von mAK mit Einschränkungen verbunden (vgl. Kap. 3.5). So kann nur ein Epitop auf dem zu bekämpfenden Antigen erkannt werden. Gerade bei komplexen Zielen wie Krebszellen, Viren oder Bakterien wäre aber das Erkennen mehrerer (vieler) Epitope für eine erfolgreiche Behandlung nötig. Die Applikation eines solchen Antikörpermisches setzt allerdings voraus, dass die einzelnen Antikörper in gleichen Mengen vorhanden sein müssen. Die Produktionszellen müssten also gleiche Mengen der verschiedenen mAK produzieren. Dies ist mit konventionell etablierten Zelllinien nicht möglich. Die Fragestellung war also, ob sich die Kassettenaustauschstrategie für die Herstellung polyklonaler Antikörper eignen würde, da nur durch die Integration der Expressionskassette in den selben Locus eine vorhersagbare Expression zu erwarten ist.

2.3.1 Etablierung verschiedener Vektorvarianten

Im Rahmen einer Kooperation wurden vier verschiedene Antikörperexpressionskassetten konstruiert. Ziel des gemeinsamen Projektes war die Etablierung neuer Zelllinien zur vorhersagbaren Produktion von Antikörpern.

Die Kassetten unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Promotorelemente und der Orientierung von schwerer und leichter Kette. Die Abbildung 2.9 gibt den Aufbau der Konstrukte wieder. So verläuft die Transkription der schweren Kette in den Vektoren pAK1 und pAK2 in derselben Richtung wie die des Neomycinresistenzgens, während die Positionen der beiden Ketten in den Konstrukten pAK3 und pAK4 getauscht wurden. Weiterhin unterscheiden sich jeweils die bidirektionalen Promotoren, welche die Transkription der beiden Ketten steuern. So wurde der adenovirale Promotor AdMLP (*adenovirus major later promoter*) mit dem murinen MT-1 (Maus Metallothionein) Promotor oder dem humanen EF-1 α (*elongation factor 1 α*) Promotor kombiniert.

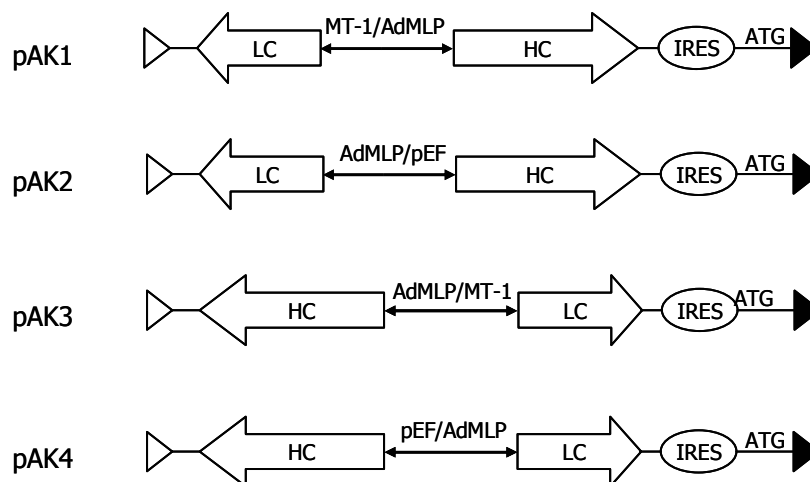


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Antikörperexpressionskassetten. LC = Leichte Kette (*light chain*); HC = Schwere Kette (*heavy chain*); Bidirektionale Promotoren: AdMLP = *adenovirus major late*; pEF = *elongation factor 1 α* ; MT-1 = Metallothionein Promotor

Für den Austausch wurden die vier Kassetten in Austauschkonstrukte integriert. Ein IRES-Element und ein ATG-Startkodon komplettieren das Neomycinresistenzgen nach sequenzspezifischer Rekombination. Die dafür nötigen FRT-Sequenzen (F1/F5) flankieren die Expressionskassette.

Die Antikörperexpression sollte in 3 verschiedenen Zelllinien, das heißt HEK293, BHK-21 und CHO-K1 ausgetestet werden. Nach der im Kap. 2.2.3 beschriebenen retroviralen Markierung

und Selektion von hoch exprimierenden chromosomalen Loci erfolgte der Austausch des Provirus gegen die Antikörperexpressionskassetten.

Um die Austauscheffizienz der Expressionskassetten ermitteln zu können, wurde ein Austausch in verschiedene Integrationsorte der drei Zelllinien durchgeführt. Dies waren die HEK293-Klone 1B2 und 3C2, die BHK-21-Klone IIIA1 und IIIA2 sowie der CHO-K1-Klon 6. Nach erfolgter Austauschtransfektion und G418-Selektion wurde die Zahl der resistenten Subklone ermittelt. Die Anzahl der auf den Selektionsplatten etablierten Klone ist in der Tabelle 2-2 zusammengefasst. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte kein eindeutiger Trend festgestellt werden, der die Bevorzugung eines Vektors für den Kassettenaustausch unterstützen würde. Allerdings lässt sich die Tendenz erkennen, dass das Konstrukt pAK4 weniger gut für den Austausch geeignet ist, da es in 4 von 5 unabhängigen Integrationsorten die geringste Klonzahl hervorbrachte. Das Konstrukt pAK3 lieferte in den beiden HEK293-Loci weniger Klone als in den Loci der Hamsterzellen BHK-21 und CHO-K1. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass Einflüsse der chromosomalen Umgebung, des Vektoraufbaus und auch zelltypische Eigenschaften die Integrationseffizienz der Austauschkassette bestimmen.

	BHK		HEK293		CHO
	<i>Klon IIIA1</i>	<i>Klon IIIA2</i>	<i>Klon 1B2</i>	<i>Klon 3C2</i>	<i>Klon 6</i>
pAK1	80 – 100	80 – 100	80 – 100	140 – 150	80 – 100
pAK2	40 – 50	40 – 50	60 – 70	100 – 120	80 – 100
pAK3	40 – 50	60 – 70	10	10	70 – 80
pAK4	5	6	4	40 – 50	4
Kontrolle	-	-	-	-	-

Tabelle 2-2: Austauscheffizienz der verschiedenen Antikörpervektoren in Klonen von BHK-21, HEK293 und CHO-K1-Zellen. $5 \cdot 10^5$ Zellen eines Klons wurden mit den verschiedenen Antikörpervektoren und dem Ffp-kodierenden Vektor pSVFLPe ko-transfiziert. Angegeben ist die Zahl der Subklone nach G418-Selektion. (Kontrolle: Transfektion der Austauschvektoren ohne pSVFLPe)

2.3.2 BHK-21 und CHO-K1-Subklone zeigen in Abhängigkeit vom Austauschvektor Rekombinationen

Die generierten Subklone der drei Zelllinien wurden mittels Southern Blot Verfahren auf einen korrekten Austausch der Expressionskassetten analysiert. Der mit *SacI* durchgeführte Verdau der genomischen DNA und die Hybridisierung einer Sonde gegen das

Neomycinresistenzgen resultiert, in Abhängigkeit vom eingesetzten Austauschkonstrukt, in unterschiedlichen Fragmentgrößen. Für die in Abbildung 2.10 gezeigten Beispiele wurden im Falle von pAK2 eine 6,7 kb Bande, für pAK3 eine 1,7 kb Bande erwartet.

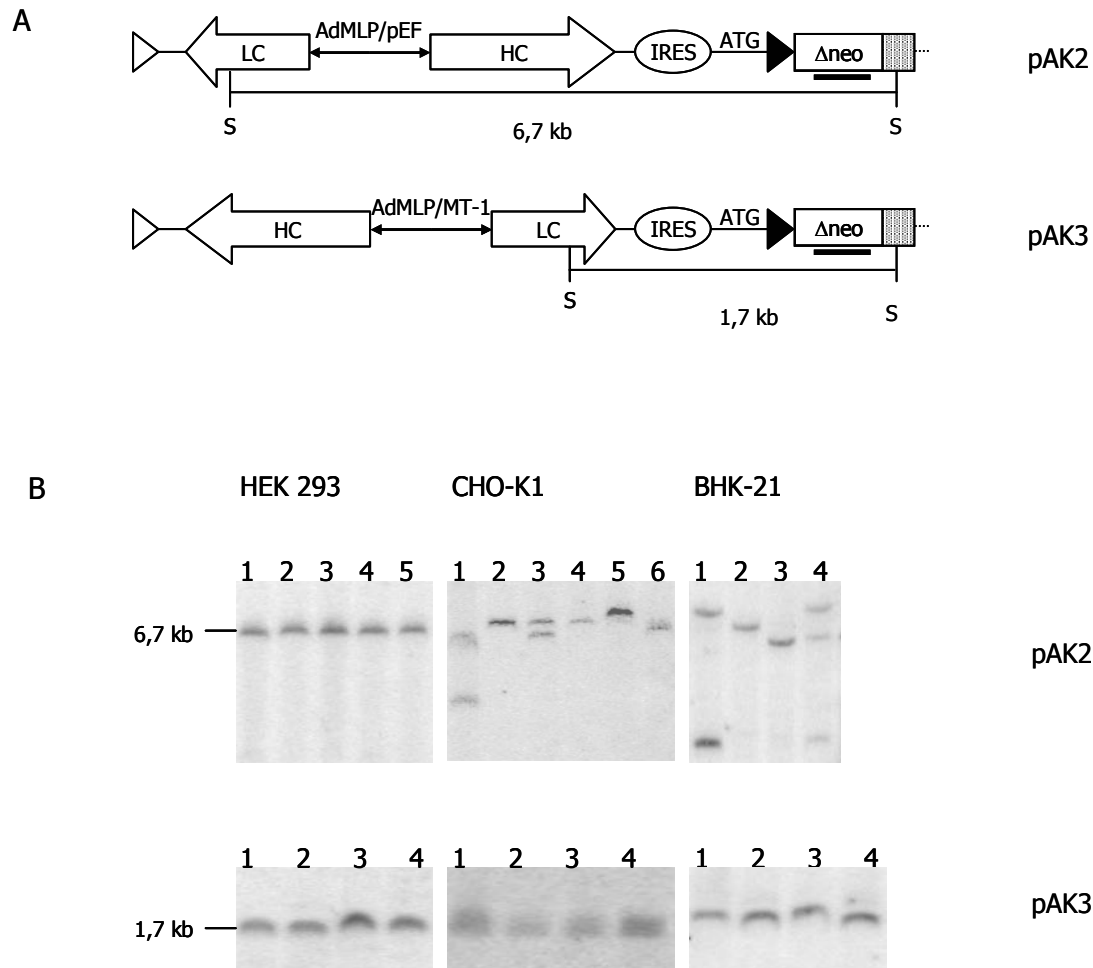


Abbildung 2.10: Kassettenaustausch mit verschiedenen Antikörpervektoren. A: Schematische Darstellung der Plasmide pAK2 und pAK3 nach Kassettenaustausch mit den *SacI*-Restriktionsstellen (S), sowie den erwarteten Bandengrößen nach Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Neomycinresistenzgen. **B:** Southern Blots der Subklone von jeweils einem Parentalklonen der drei verwendeten Zelllinien. In der oberen Reihe wurden 5 HEK293, 6 CHO-K1 sowie 4 BHK-21-Subklone aufgetragen, die nach Austausch mit dem Konstrukt pAK2 selektiert wurden, in der unteren Reihe jeweils 4 Subklone nach Austausch mit pAK3.

Bei der Analyse stellte sich heraus, dass alle 50 überprüften Subklone der beiden HEK293-Parentalklone 1B2 und 3C2 die erwarteten Bandengrößen aufwiesen. Dies war unabhängig vom verwendeten Austauschkonstrukt. Nur zwei der Subklone hatte ein zusätzliches Integrat des Austauschvektors, was in einer zweiten Bande neben der erwarteten sichtbar wurde (nicht gezeigt).

Die Southern Blot Analyse der BHK-21 und CHO-K1-Subklone erbrachte ein abweichendes Bild. Die Integration der Kassetten pAK1 und pAK2 führte in Parentalklonen beider Zelllinien zu Rekombinationen in den Subklonen. Die Abbildung 2.10 B gibt einen Vergleich zwischen Subklonen aller 3 Zelllinien wieder. Während alle HEK293-Subklone die erwarteten 6,7 kb Fragmente zeigen, wiesen nur die CHO-K1-Subklone 2, 4 und 6 die richtige Bandengröße auf. In den übrigen Subklonen sind Doppelbanden beziehungsweise zu große Fragmente zu erkennen. Nach dem Kassettenaustausch der BHK-21-Klone mit demselben Antikörperkonstrukt konnte im gezeigten Beispiel nur der Subklon 2 als korrekt identifiziert werden. Ein ähnliches Verhältnis von korrekt und nicht korrekten Subklonen ergaben mehrere unabhängige Austauschexperimente mit pAK1 und pAK2. Man kann demnach daraus schließen, dass die Konstellation dieser Antikörperkassetten in Subklonen der beiden Hamsterzelllinien ungünstig ist und in den untersuchten Integrationsorten zu Rekombinationen führen kann.

Ein anderes Resultat ergab der Kassettenaustausch mit den beiden Konstrukten pAK3 und pAK4. Die vier in der Abbildung 2.10 B (untere Reihe) jeweils analysierten Subklone von HEK293, CHO-K1 und BHK-21 zeigen nach Austausch mit pAK3 die richtige Bandengröße von 1,7 kb. Die Konstellation der genetischen Elemente im Austauschkonstrukt, hier also die Orientierung der schweren und leichten Kette im Bezug zum Neomycinresistenzgen in der Parentalzelle, entscheidet über die Integrität der Expressionskassette in den Integrationsorten der Zelllinien BHK-21 und CHO-K1. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Experimente mit der Antikörperkassette pAK4, in denen ebenfalls alle analysierten Subklone das erwartete Bandenmuster aufwiesen (nicht gezeigt).

2.3.3 Vergleich der Antikörperexpression in verschiedenen Zelllinien

Im folgenden Abschnitt wird die Antikörperexpressionshöhe der Subklone nach korrektem Austausch des Provirus gegen die Kassetten pAK1 bis pAK4 beschrieben.

Für die Analyse wurden das Provirus des HEK293-Klons 1B2, des BHK-21-Klons IIIA1 und des CHO-Klons 6 ausgetauscht. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe des ELISA (*enzyme linked immune staining assay*) ermittelt und stellen Mittelwerte von mindestens drei Subklonen pro Antikörperkonstrukt dar, welche nachweislich die erwartete Integration des Austauschkonstrukts zeigten.

Ein erster Vergleich der Zelllinien untereinander macht deutlich, dass die Zellen des HEK293-Klons 1B2 bis zu sechsmal mehr Antikörper produzieren können als beispielsweise CHO-K1-Zellen und dreimal mehr als BHK-21-Zellen, deren provirales Integrat gegen die gleichen

Kassetten ausgetauscht wurde (Abbildung 2.11 A, pAK4). So erreichte die spezifische Antikörperproduktion q_{AK} der HEK293-Zellen etwa 3500 ng pro $1 \cdot 10^6$ Zellen in 24h nach Austausch mit dem Konstrukt pAK4 und stellt damit die insgesamt höchste gemessene Expression dar. Dieser Wert entspricht 3,5 pcd (pg pro Zelle pro Tag), eine Einheit die im Folgenden verwendet werden soll. Die übrigen Konstrukte lieferten im gleichen Integrationsort 1B2 0,75 pcd (pAK1), 1,5 pcd (pAK3) und 1,7 pcd (pAK2). Die spezifische Produktivität der CHO-K1-Zellen wies unabhängig von der Antikörperkassette ein homogenes Bild auf und übertraf nicht 0,6 pcd. Die mit 1,3 pcd beste spezifische Produktivität in BHK-21-Zellen wurde nach Austausch mit den beiden Konstrukten pAK3 und pAK4 erzielt.

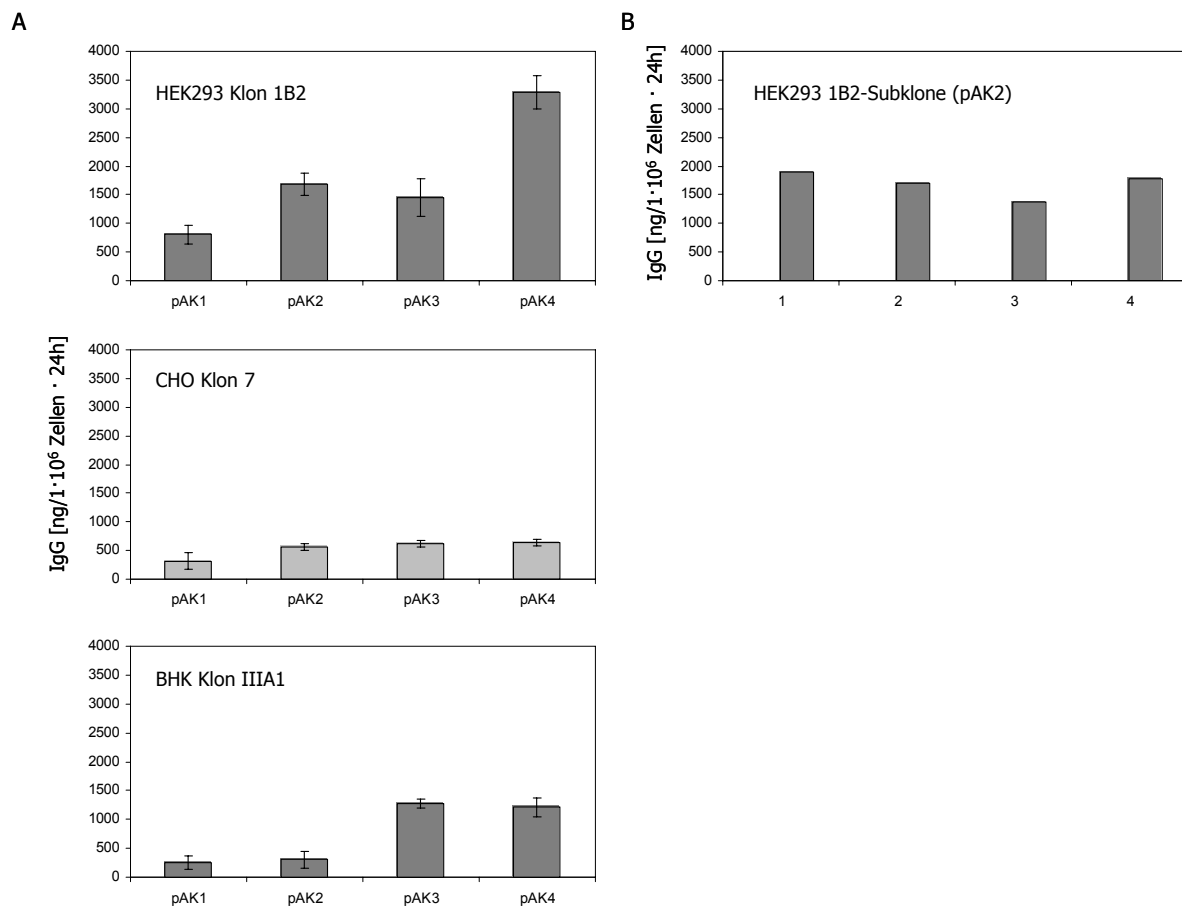


Abbildung 2.11: Antikörperexpression von Subklonen nach Austausch mit den vier Antikörperexpressionskassetten in Parentalklone von HEK293, BHK-21 und CHO-K1. A: Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Produktion von mindestens 3 Subklonen pro Austauschvektor. B: Beispiel der homogenen Antikörperexpression von 4 isogenen Subklonen des HEK293-Klons 1B2 nach Austausch gegen das Konstrukt pAK2.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass die verwendeten Austauschkonstrukte in den überprüften Integrationsorten der verschiedenen Zelllinien zu ähnlichen spezifischen Produktivitäten führen. Wenngleich die Subklone des HEK293-Klons 1B2 eine tendenziell höhere Menge Antikörper exprimierten, kann keine Empfehlung für einen bestimmten Austauschvektor oder eine Zelllinie für die Antikörperproduktion abgeleitet werden. Allen isogenen Subklonen der jeweiligen Integrationsorte gemeinsam ist eine homogene Expression der integrierten Antikörperkassette. Als repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 2.11 B die Expression von 4 isogenen Subklonen des HEK293-Integrationsortes 1B2 nach Austausch gegen das Konstrukt pAK2 dargestellt. Damit folgen die Antikörperklone der homogenen Expression des Reportergens β -Galaktosidase (vgl. Kap. 2.2.5). Dies ist besonders im Hinblick auf die spätere Verwendung dieses Systems wichtig, da nur eine vorhersagbare Expression die eingangs erwähnte Produktion polyklonaler Antikörper ermöglicht.

2.3.4 Der Aufbau des Austauschvektors kann die Stabilität der Expression beeinflussen

Wie in den vorhergehenden Kapiteln erwähnt, ist die Stabilität der Proteinexpression eines Produzenten ein wichtiges Kriterium für seine Verwendung. Zur Feststellung dieser Eigenschaft wurden die beschriebenen Subklone der Integrationsorte ohne Selektionsdruck, dass heißt ohne G418, kultiviert.

Die Subklone der Kassette pAK2 produzierten auch in Abwesenheit des Selektionsdruckes konstante Mengen des Antikörpers. Für die übrigen Konstrukte reduzierte sich nach vier Tagen die Antikörperexpression der Subklone, unabhängig von Zelllinie und Integrationsort. Nach acht Tagen konnte kein Produkt mehr nachgewiesen werden. In der Abbildung 2.12 ist beispielhaft die Antikörperproduktion in HEK293-1B2-Subklonen über einen Zeitraum von 12 Tagen dargestellt. Deutlich erkennbar ist das Absinken der Produktivität bis zum völligen Erliegen in Subklonen der Antikörperkassetten pAK1, pAK3 und pAK4, während die Produktion der pAK2-Subklone über die gesamte Kultivierungsdauer stabil blieb. Nachfolgend sollte festgestellt werden, ob die Zellen durch erneuten Selektionsdruck wieder Antikörper exprimieren können.

Nach Zugabe des Selektionsdrucks konnte zunächst in den Subklonen der Kassetten pAK1, 3 und 4 ein verstärkter Zelltod beobachten werden, während die pAK2-Zellen nicht beeinflusst waren. Nach vier Tagen Kultivierung unter Selektionsdruck stellte sich der anfängliche Wert der Antikörperproduktion in allen Subklonen wieder ein. Offenbar haben die jeweilige

Ausrichtung der beiden Antikörperketten und die Natur der Promotoren in einer Austauschassette Auswirkungen auf die Stabilität der Expression.

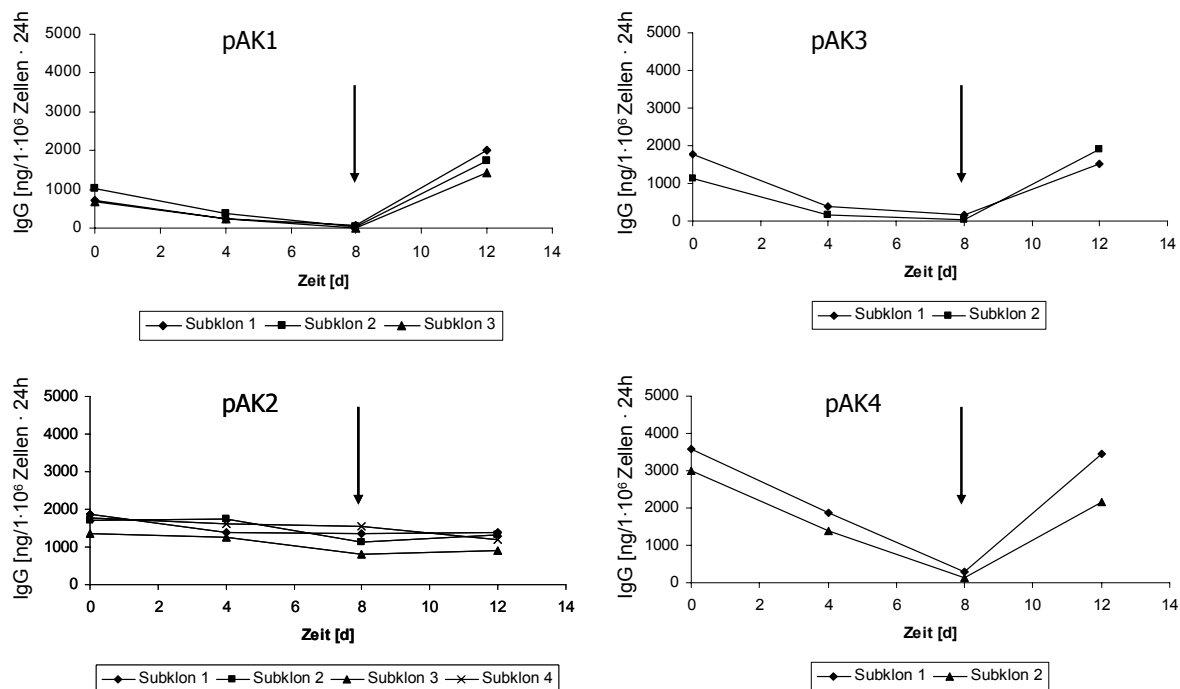


Abbildung 2.12: Antikörperexpression von Subklonen des HEK293-Parentalklons 1B2 nach Austausch mit vier verschiedenen Antikörperkonstrukten. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der G418-Zugabe.

Mittels einer Southern Blot Analyse der Subklone konnte festgestellt werden, dass der Locus der integrierten Antikörperkassetten in allen Subklonen intakt war und keine Deletion von Teilen der Kassette dem Verlust an Expression zugrunde liegt (nicht gezeigt). Somit kann ein Abschalten (*silencing*) der Transkription der Kassette ohne Gendeletion oder Rekombination in einem Großteil der Zellen vermutet werden. Nach Zugabe des Selektionsmittels G418 wuchsen dann die Zellen verstärkt, die eine höhere Transkription des Neomycinresistenzgens und somit der Antikörperkassette zuließen. Da das Abschalten der Antikörperexpression in mehreren unabhängigen Integrationsorten beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass der Aufbau der Expressionskassette für dieses Resultat verantwortlich ist und somit für künftige Vektorkonstruktionen berücksichtigt werden muss.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die Expressionsdaten der Subklone verglichen, die nach Austausch mit dem Antikörperkonstrukt pAK2 etabliert wurden. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Integrationsorten wurden Subklone des HEK293-Klons 3C2 und des BHK-21-Klons IIIA2 in die Analyse einbezogen. In der Abbildung 2.13 sind die Mittelwerte

der spezifischen Produktivität von mindestens 3 Subklonen je Integrationsort dargestellt. Es wird deutlich, dass der HEK293-Parentalklon 1B2 die höchste Antikörperausbeute liefert. Etwa 1,7 pcd stehen Ausbeuten zwischen 0,3 und 0,8 pcd gegenüber. Auffällig sind auch die Unterschiede zwischen den beiden HEK293-Klonen. Die Subklone des Integrationsortes 3C2 zeigen eine 8-fach geringere spezifische Produktivität als die von 1B2. Auch die BHK-Subklone zeigen unterschiedliche Expressionen. Während die IIIA1-Subklone etwa 0,3 pcd freisetzen konnte für die IIIA2-Subklone eine Produktivität von 0,85 pcd bestimmt werden. Dieses Resultat korreliert mit den für diese Integrationsorte gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten (vgl. Abbildung 2.8). Die Subklone von IIIA2 zeigten eine doppelt so hohe Aktivität wie die des Parentalklons IIIA1. Der Integrationsort des retroviralen Vektors bestimmt somit die Transkriptionseffizienz der Produzentenzelllinie.

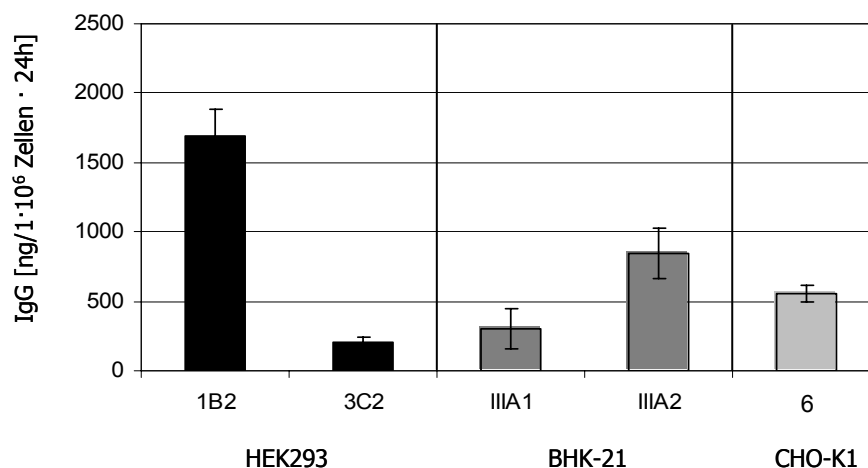


Abbildung 2.13: Antikörperexpression der Subklone von 2 HEK293, 2 BHK und 1CHO-Parentalklon nach Austausch mit dem Antikörperkonstrukt pAK2. Die Expressionsdaten entsprechen Mittelwerten von mindestens 3 Subklonen je Parentalklon.

Da für den Vergleich der drei Zelllinien nur ein CHO-K1-Parentalklon zur Verfügung stand, kann diese Auswertung nur wenige Anhaltspunkte für den Einsatz von CHO-K1-Zellen als flexible Produzentenzelllinie geben. Es kann aber festgestellt werden, dass der in diesen Zellen markierte Locus keine höheren Expressionen zuließ als die der HEK293 und BHK-21-Zellen. Die Subklone produzierten nach Austausch mit der Antikörperexpressionskassette pAK2 etwa 0,6 pcd.

Der Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkonstrukte beeinflusst sowohl die Höhe als auch die Stabilität der Expression. Nur mit einem der vier Austauschvektoren konnte eine stabile Antikörperproduktion ohne Selektionsdruck nachgewiesen werden. Trotzdem haben die Ergebnisse gezeigt, dass die generierten Subklone eines Integrationsortes homogene Mengen des Antikörpers produzieren, also eine Vorhersagbarkeit der Proteinexpression gewährleistet ist.

2.4 Die Etablierung einer retroviralen Produzentenzelllinie

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt den Einsatz der Kassettenaustauschstrategie für die Etablierung von retroviralen Produzentenzellen.

Die Standardmethode zur Produktion von retroviralen Vektoren beruht auf der Verpackung der rekombinanten RNA in retroviralen Helferzellen (Verpackungszellen). Konventionell etablierte Verpackungszelllinien exprimieren die Helferfunktionen gag/pol und env von getrennten Expressionskassetten. Zur Produktion infektiöser Partikel wird der retrovirale Vektor in die Zellen transfiziert. Anschließend werden Klone isoliert, die das Retrovirus in optimaler Höhe exprimieren.

In dieser Arbeit wurde eine prinzipiell unterschiedliche Strategie verwendet (Abbildung 2.14). Hierfür wurden die isolierten Parentalklone 1B2 und 3C2 der HEK293-Zelllinie eingesetzt (Kap. 2.2.3). Zur Etablierung von virusproduzierenden Verpackungszellen wurden die Helferfunktionen gag/pol und env in die markierten Zellen transduziert. Diese Methode erlaubt das Screening nach einer hohen Virusproduktion (Titer), also eine optimale Expressionshöhe der für die Virusproduktion benötigten Elemente. Der Klon mit dem höchsten retroviralen Titer sollte als Masterzelllinie verwendet werden. Durch das Kassettenaustauschsystem sollte es nun möglich sein, therapeutische Vektoren in den retroviralen Locus zu integrieren und die dabei entstehenden Subklone zu isolieren. Es sollte überprüft werden, ob mit dieser Strategie hohe und vorhersagbare Titer erzielt werden können und ob die ausgetauschten Subklone der Masterzelllinie zur Produktion von therapeutischen Retroviren geeignet sind.

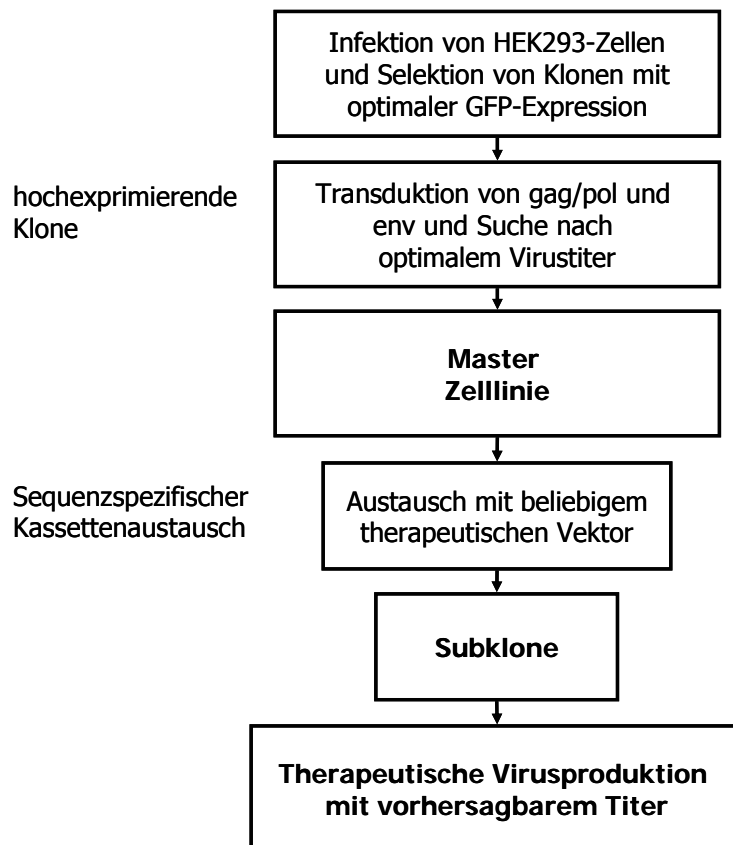


Abbildung 2.14: Übersicht der Strategie zur Etablierung einer neuen retroviren Verpackungszelllinie.

2.4.1 Etablierung der Masterzelllinie Flp293A

Für die Etablierung der retroviren Produzentenzelllinie wurden die HEK293-Parentalklone 1B2 und 3C2 ausgewählt, da beide eine stabile GFP-Expression zeigten. Weiterhin konnte mit diesen Klonen bereits erfolgreich der Kassettenaustausch und eine nachfolgende rekombinante Proteinexpression nachgewiesen werden. Ein zusätzlicher Grund für den Einsatz von HEK293-Zellen für diesen Zweck war, dass auf der Basis dieser Zelllinie bereits gute Produzenten von Retroviren hergestellt werden konnten (Davis et al., 1997; Forestell et al., 1997; Sheridan et al., 2000).

Zur Komplettierung einer funktionsfähigen Verpackungszelllinie wurden beide Klone mit den viralen Helferfunktionen gag/pol und env transduziert (vgl. Abbildung 2.14). Die transduzierten Zellen sollten dann den retroviren Markierungsvektor pTAGeGFP in infektiöse Partikel verpacken können. Für die Expression von gag/pol wurde der von Cosset entwickelte Vektor pCeb verwendet (Cosset et al., 1995). Er kodiert für das wildtyp gag/pol Gen des *moloney mouse leukemia virus* (MoMLV) und den Selektionsmarker *bsr*, der die Resistenz gegen Blasticidin vermittelt. Die Transkription unterliegt der Kontrolle des MoMLV-

LTR. Beide Gene sind durch eine 72 bp „Spacersequenz“ getrennt, welche eine Reinitiation der Translation des zweiten Cistrons erlaubt. Allerdings ist diese Reinitiation nicht effizient, sodass dieses System die Selektion von Klonen erlaubt, die eine hohe gag/pol Expression aufweisen, denn nur diese sind blasticidinresistent. Das amphotrope Hüllprotein env und die Resistenz gegen Histidinol (*his*) werden von dem Vektor pENVAhis kodiert (Spitzer et al., 1999).

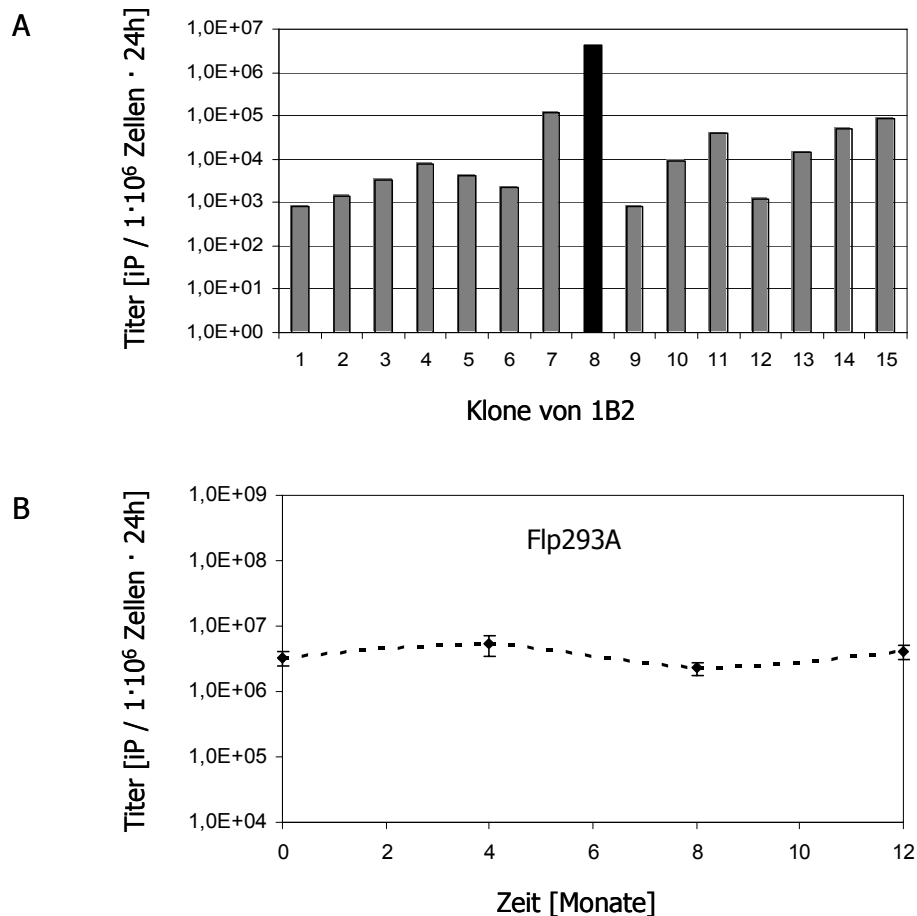


Abbildung 2.15: Retroviraler Titer gag/pol und env transduzierter Klone des Integrationsortes 1B2. A: Vergleich der analysierten Klone. Die Virusproduktion von 1B2-8, im Weiteren als Flp293A benannt, ist mit dem schwarzen Balken gekennzeichnet. B: Langzeitstabilität der Virusproduktion von Flp293A.

Nach der Ko-Transfektion von 5 µg jedes Vektors und Selektion auf beide Resistenzen (*bsr* und *his*) wurden jeweils 50 Klone der Parentalklone 1B2 und 3C2 auf ihren viralen Titer überprüft. Dazu wurden mit den Zellkulturüberständen NIH3T3-Zellen infiziert und diese anschließend per Durchflusszytometrie analysiert. Der retrovirale Markierungsvektor pTAGeGFP wird von den Zellen verpackt und das eGFP-Reportergen (vgl. Abbildung 2.1) erlaubt eine schnelle Titermessung durch die Bestimmung der Anzahl der GFP-positiven

NIH3T3-Zellen. In der Abbildung 2.15 A sind auszugsweise die viralen Titer von 15 gag/pol und env transduzierten Klonen des Parentalklons 1B2 dargestellt. Die transfizierten Klone produzierten etwa 10^3 bis 10^6 infektiöse Partikel (iP) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen in 24h. Von den insgesamt 50 analysierten Klonen wurde derjenige mit der höchsten Virusproduktion für weitere Experimente ausgewählt. Die Resultate der Titerbestimmungen zeigen, dass der chromosomale Locus 1B2 zu einer hohen Virusproduktion führt. Der Klon 1B2-8, im Folgenden als Flp293A bezeichnet, setzte reproduzierbar $4,1 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h frei.

Im Gegensatz dazu erreichte keiner der 50 gag/pol und env transfizierten Klone von 3C2 dieses Ergebnis. Der höchste gemessene Titer der von Produzenten dieses Integrationsortes erzielt wurde, entspricht mit $2 \cdot 10^5$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen nur etwa 5% der Produktivität von Flp293A. Diese Resultate zeigen Übereinstimmungen mit den Messungen der Antikörperexpression. Der markierte Integrationsort von 1B2 führte in diesem Fall zu einer achtfach höheren Antikörperexpression als nach Integration des gleichen Antikörperkonstrukts in den Locus von 3C2 (vgl. Abbildung 2.13). Interessant an diesen Beobachtungen ist die Tatsache, dass beide Parentalklone aus der gleichen FACS-Sortierung stammen und eine ähnlich hohe GFP-Expression zeigen. Offenbar führen die auf der Basis dieses Reportergens isolierten Integrationsorte nicht zwangsläufig zu guten Produzentenzellen.

Die Zelllinie Flp293A wurde hinsichtlich der Langzeitstabilität der Virusproduktion charakterisiert. Hierzu wurden die Zellen ohne Selektionsdruck kultiviert und in regelmäßigen Abständen eine Titeranalyse durchgeführt. Die Virusproduktion war über einen Zeitraum von mehr als 12 Monaten stabil. Die Auswertung der Analyse ist in der Abbildung 2.15 B wiedergegeben. Dies zeigt, dass der Klon Flp293A sowohl die retrovirale Kasette als auch die Helferfunktionen stabil exprimiert. Daher wurde er als „Masterzelllinie“ ausgewählt und Austauschexperimenten unterzogen (vgl. Abbildung 2.14).

2.4.2 Evaluierung von retroviren Austauschvektoren

Für die sequenzspezifische Integration anderer retroviraler Vektoren in den markierten Locus von Flp293A wurden verschiedene Austauschvektoren entwickelt. Ziel war die Evaluierung eines geeigneten Konstrukts mit einem Aufbau der sowohl den effizienten Kassettenaustausch als auch eine hohe Transgenexpression zulässt. Aus den Ergebnissen der Antikörperexpression (Kap. 2.3) ließ sich ableiten, dass bestimmte Orientierungen der Expressionskasette und die Auswahl der Promotoren den Erfolg der Austauschexperimente

bestimmen. Daher wurden mehrere unterschiedliche Konstruktionen getestet. Der schematische Aufbau der retroviralen Vektoren ist in der Abbildung 2.17 dargestellt. Allen Vektoren gemeinsam ist, dass Wildtyp (F1) und die mutierte FRT-Sequenz (F5) den kompletten retroviralen Vektor flankieren, inklusive beider LTRs und dem Transgen. In den Vektoren pMLCMeGFP und pMLCMeGFP_{rev} wurde ein CMV-Promotor funktional mit einem ATG-Startkodon in einer Weise verbunden, dass das Neomycinresistenzgen durch die sequenzspezifische Rekombination in Flp293A-Zellen komplettiert wird. Beide Vektoren unterscheiden sich in der Ausrichtung der retroviralen Kassette in Bezug zum CMV-Promotor (Abbildung 2.17). Während im Vektor pMLCMeGFP die Transkription des Retrovirus und des Neomycinresistenzgens in die gleiche Richtung erfolgt, wurde im Vektor pMLCMeGFP_{rev} die reverse Orientierung der retroviralen Expressionskassette benutzt. In diesen beiden Konstrukten muss der CMV-Promotor die G418-Resistenz der ausgetauschten Subklone über ein zweite, unabhängige mRNA gewährleisten. Von Verhoeyen et al. (2001) wurde gezeigt, dass die Verwendung eines CMV-Promotors zu Interferenzen mit dem retroviralen LTR führen kann. Das Resultat waren geringe oder instabile Expressionen des Reportergens β -Galaktosidase. Mit den CMV-Konstrukten sollte überprüft werden, ob sich diese Interferenzen auch auf verschiedene retrovirale Austauschketten auswirken.

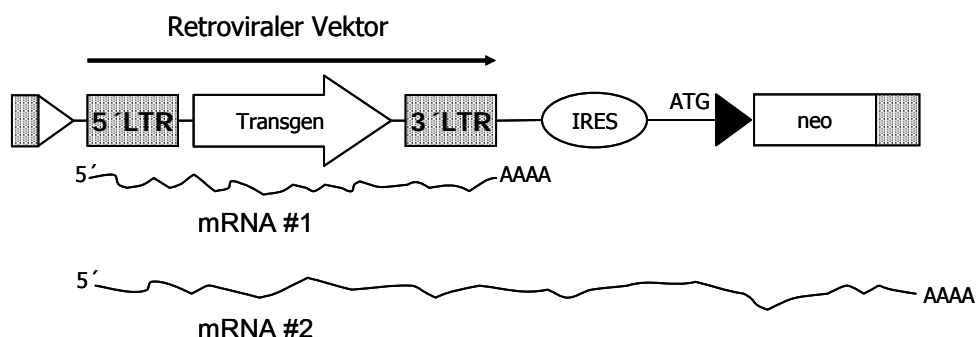


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung eines retroviralen Austauschvektors nach Integration in den markierten Locus von Flp293A. Die Transkription der mRNAs #1 und #2 wird vom retroviralen 5'LTR-Promotor gesteuert und setzt bei mRNA #2 eine Durchleseaktivität über das poly(A) Signal des 3'LTR voraus. Dies führt dazu, dass ein Großteil der Transkripte die mRNA #1 enthält, während ein kleiner Anteil aus der zweiten mRNA besteht.

In den Austauschvektoren pMSIReGFP, pMLIReGFP und pSINeGFP wurde ein IRES-Element für die Aktivierung des Neomycinresistenzgens eingesetzt. In Abbildung 2.16 ist ein retroviraler Vektor mit einem IRES-Element nach dem Austausch schematisch dargestellt. Der 3'LTR des retroviralen Vektors fungiert als poly(A)-Signal. Dies bedeutet eigentlich eine Termination der Transkription nach der Synthese der mRNA #1 (retroviraler Vektor). Für die

IRES-Konstrukte sollte ausgenutzt werden, dass trotz poly(A)-Signal ein „Durchlesen“ der RNA-Polymerase erfolgen kann (Herman und Coffin, 1986). Das Resultat ist eine bicistronische mRNA (mRNA #2), welche für den retroviralen Vektor und die Neomycinresistenz kodiert.

Die Vektoren unterscheiden sich weiterhin in den eingesetzten LTRs. So basiert das Konstrukt pMSIReGFP auf dem MSCV (*murine stem cell virus*). Da die Parentalkassette ebenfalls von einem MSCV-LTR gesteuert wird, kann man den Austausch gegen pMSIReGFP als konservativ bezeichnen. Die Vektoren pMLIReGFP, pMLCMeGFP und pMLCMeGFP_{Prev} hingegen wurden auf der Grundlage eines ML-Virus (*murine leukemia virus*) konstruiert. Eine Ausnahme stellt der Vektor pSINeGFP dar. Die Transkription der retroviralen Kassette und des Neomycinresistenzgens wird in der Verpackungszelllinie von einem CMV-Promotor übernommen, da der retrovirale LTR-Promotor deletiert ist. Nach Infektion der Zielzellen wird die Transkription des GFP Reportergens von einem humanen EF-1 α -Promotor gesteuert. Für den direkten und schnellen Vergleich der retroviralen Titer nach dem Kassettenaustausch wurden alle Vektoren mit dem eGFP-Reportergen ausgestattet.

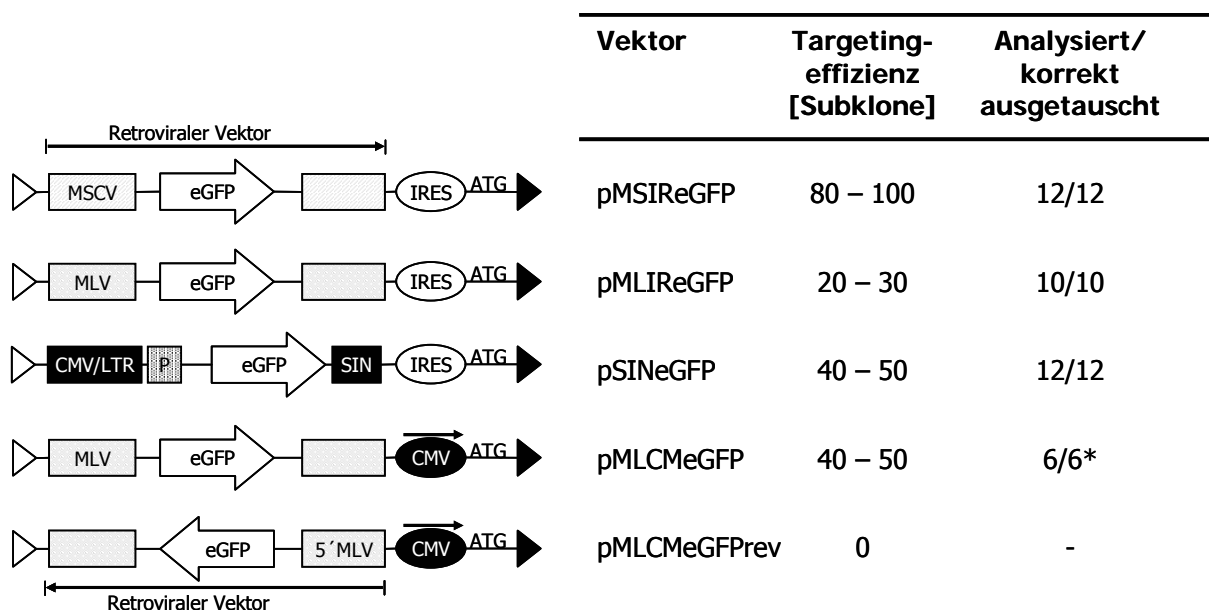


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung der retroviralen Austauschvektoren und der Austauscheffizienz. * Ein Subklon dieses Vektors zeigte neben dem korrekten Kassettenaustausch eine zusätzliche, zufällige Integrationsstelle.

Die Ko-Transduktion der Vektoren und des Flp-kodierenden Plasmids wurde, wie bereits im Abschnitt 2.2.5 beschrieben, durchgeführt. Nach der G418-Selektion der transfizierten Zellen wurde in einem repräsentativen Experiment zunächst die Anzahl der entstandenen Klone

bestimmt. In der Abbildung 2.17 sind neben den einzelnen Austauschvektoren die Austauscheffizienzen, das heißt die Anzahl der nach dem Kassettenaustausch entstandenen Klone, wiedergegeben. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die reverse Orientierung der retroviralen Kasette im Vektor pMLCMeGFP_{rev} keine Subklone hervorbrachte. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die bereits von Verhoeven et al. (2001) beschriebenen Promotorinterferenzen zwischen dem viralen LTR und dem CMV-Promotor zurückzuführen. Im Falle der 5'-3'-Orientierung der gleichen Kasette im Vektor pMLCMeGFP konnten im Gegensatz dazu 40–50 Klone gezählt werden. In dieser Konstellation ist der virale LTR weiter vom CMV-Promotor entfernt. Dies könnte ein Grund für die erfolgreiche Transkription des Neomycinresistenzgens sein.

Die mit 80–100 Klonen höchste Zahl wurde nach dem Kassettenaustausch mit pMSIREGFP bestimmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle Austauschvektoren Subklone hervorbrachten. Lediglich die revers orientierte Kasette des Vektors pMLCMeGFP_{rev} war für den Austausch ungeeignet.

Die etablierten Subklone wurden nach G418-Selektion isoliert und auf korrekte sequenzspezifische Rekombination hin untersucht. Dazu wurde die zelluläre DNA mit *SacI* verdaut und abhängig vom eingesetzten Vektor mit Sonden gegen das IRES-Element oder den CMV-Promotor hybridisiert. Als Beispiel für die Southern Blot Analyse der Subklone ist der Kassettenaustausch mit dem Vektor pMSIREGFP in der Abbildung 2.18 gezeigt. Die Restriktion mit *SacI* und die Hybridisierung der genomischen DNA mit einer IRES-Sonde sollten in den Subklonen zu einem Signal in der Laufhöhe von etwa 1,9 kb führen. Der Parentalklon Flp293A hingegen sollte ein 3,8 kb Fragment aufweisen. Der Southernblot von 8 aufgetragenen Subklonen nach sequenzspezifischer Rekombination mit pMSIREGFP bestätigte die Erwartungen. Alle Subklone zeigen die erwartete Bandengröße von 1,9 kb, während sich das Signal des Parentalklons Flp293A deutlich unterscheidet. Insgesamt wurden 40 verschiedene Subklone der eGFP-Austauschvektoren analysiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls tabellarisch in der Abbildung 2.17 zusammengefasst. Sie zeigen die Anzahl der analysierten Subklone des jeweiligen Vektors neben der Zahl der korrekt ausgetauschten. Sie bestätigen die Resultate, die bereits nach dem Kassettenaustausch in HEK293-Zellen mit der β -Galaktosidasekasette, beziehungsweise den Antikörpervektoren erzielt wurden, da alle Subklone die erwarteten Bandengrößen aufwiesen. Auch bei diesem Kassettenaustausch spielte die zufällige Integration der Vektoren keine Rolle. Nur in einem von 40 analysierten Subklonen der retroviralen Austauschvektoren wurde eine zusätzliche Kopie nachgewiesen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl das IRES-Element als auch der CMV-Promotor zur Komplementation des Neomycinresistenzgens führen und so eine

stringente Selektion auf den korrekten Kassettenaustausch vermitteln können. Ausgehend von der Austauscheffizienz können demnach beide Varianten für Austauschvektoren verwendet werden. Weiterhin ist auch der Einsatz von MSCV und MLV-LTR für einen Kassettenaustausch möglich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der retroviralen Kasette im Bezug zum CMV-Promotor entscheidend für den Austausch ist, da eine reverse Ausrichtung die Etablierung von Subklonen vollständig verhinderte.

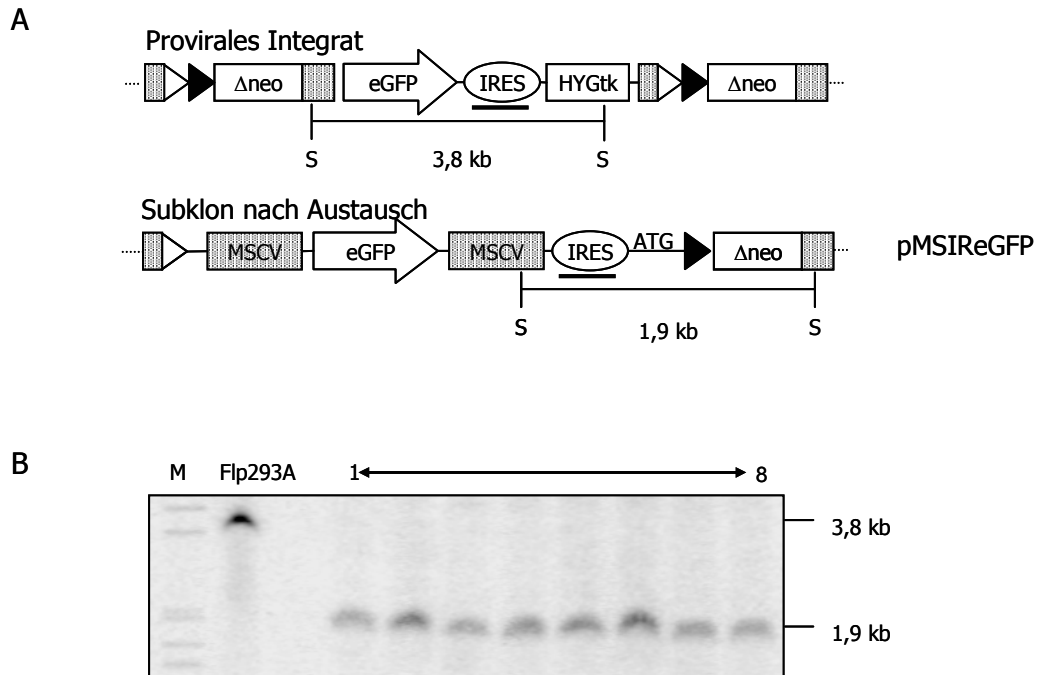


Abbildung 2.18: Southern Blot Analyse der Subklone nach Kassettenaustausch mit pMSIReGFP. A: Schematische Darstellung des Provirus und des Austauschvektors nach Integration sowie der *SacI*-Restriktionsstellen (S). **B:** Southern Blot des Parentalklons (Flp293A) und ausgetauschter Subklone (1-8). Es wurde eine IRES-Sonde verwendet.

2.4.3 Der Kassettenaustausch führt zu einer homogenen Virusproduktion der isogenen Subklone

Nachdem die Austauscheffizienz der verschiedenen Konstrukte bestimmt wurde, sollten nun die Vektoren hinsichtlich der Virusproduktion charakterisiert werden. Hierfür wurden die retroviralen Titer bestimmt und miteinander verglichen.

Die uniforme Expression der Subklone nach dem Kassettenaustausch mit dem β -Galaktosidase-kodierenden Vektor pTAREMCV ist bereits im Abschnitt 2.2.5 beschrieben

worden. Die untersuchten isogenen Subklone der Vektoren pMSIReGFP, pMLIReGFP und pSINeGFP zeigten untereinander ebenfalls einen homogenen Titer. In der Abbildung 2.19 A sind die viralen Titer von Subklonen als auch der Masterzelllinie Flp293A dargestellt. Für die Berechnung wurden Virustiter von mindestens 5 Subklonen je Austauschvektor bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2-3 zusammengefasst. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

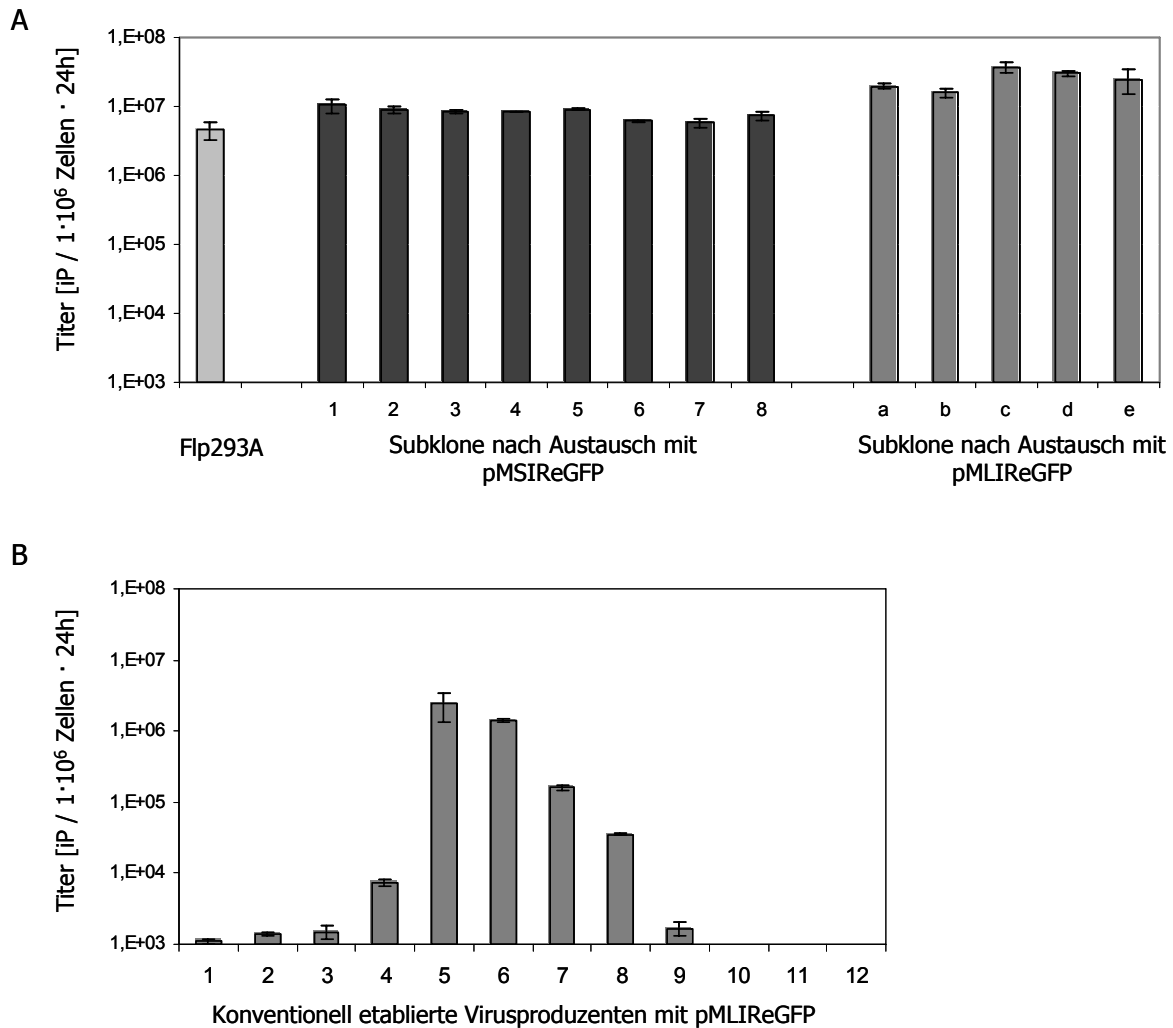


Abbildung 2.19: Retroviraler Titer der Austauschvektoren pMSIReGFP und pMLIReGFP. A: Acht Subklone wurden nach dem Kassettenaustausch der Masterzelllinie mit pMSIReGFP (1-8) und fünf mit pMLIReGFP (a-e) selektiert und analysiert. **B:** Virusproduktion von zwölf Klonen nach Ko-Transfektion von pMLIReGFP und dem Puromycinresistenz-kodierenden Vektor pBSPacΔP im Verhältnis 5:1 in die Verpackungszelllinie PT67. Die Zellen wurden mit Puromycin selektiert und willkürlich gepickt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Vektors pMSIReGFP zu einer Virusproduktion von $8,1 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$ iP/1·10⁶ Zellen · 24h führt. In diesem Vektor liegt, wie in der Ausgangszelllinie, ein MSCV-Promotor vor. Tatsächlich führte die Verwendung des

gleichen LTR zu einem etwa 2fach erhöhten Titer im Vergleich zum Parentalklon Flp293A. Die Unterschiede sind also nicht signifikant.

Die Auswertung der Virusproduktionen von fünf unabhängigen pMLIReGFP-Subklonen ergab einen durchschnittlichen Titer von $2,5 \cdot 10^7$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h mit einer Standardabweichung von $7,9 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h. Durch den Einsatz dieses MLV-basierenden Vektors gelang es somit den retroviralen Titer im Vergleich zum Parentalklon um das 6fache zu erhöhen. Weiterhin führte die Verwendung des SIN-Austauschvektors pSINeGFP in 12 getesteten Subklonen zu einer Virusproduktion von $1,2 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h. Die Ergebnisse der Titerbestimmungen zeigen, dass verschiedene retrovirale „Vektordesigns“, einschließlich SIN-Vektoren, im markierten Integrationsort von Flp293A zu hohen Titern führen.

Klone	Retroviraler Titer [iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h]
1B2-8	$4,1 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$
- pMSIReGFP	$8,1 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$
- pMLIReGFP	$2,5 \cdot 10^7 \pm 7,9 \cdot 10^6$
- pSINeGFP	$1,2 \cdot 10^6 \pm 6,2 \cdot 10^5$
- pMLCMeGFP	$< 1,0 \cdot 10^3$

Tabelle 2-3: Retroviraler Titer nach Kassettenaustausch mit den eGFP-Vektoren. Die Angaben verstehen sich als Mittelwerte von mindestens 5 Subklonen je Vektor.

Ein unerwartetes Ergebnis lieferten die Subklone des Vektors pMLCMeGFP. In diesem Vektor steuert der CMV-Promotor die Transkription des Neomycinresistenzgens. Der Kassettenaustausch führte in keinem Subklon aus unabhängigen Austauschexperimenten zur Virusproduktion (Nachweisgrenze: $1 \cdot 10^3$ iP/ml). Erstaunlicherweise exprimierten diese Zellen sehr wohl eGFP. Diese Feststellung spricht gegen eine generelle Inhibierung der Transkription der retroviralen Kasette. Außerdem konnte eine korrekte Integration der Kasette mittels Southern Blot Analyse nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um auszuschließen dass Klonierungsartefakte für dieses Phänomen verantwortlich sind, wurde in einem weiterführenden Experiment die retrovirale Kasette aus dem Vektor pMLCMeGFP herausgeschnitten und in die murine Verpackungszelllinie PT67 transfiziert. Die Population der mit der retroviralen Kasette transfizierten Zellen produzierte effizient Retroviren (Daten nicht gezeigt). Als Vergleich wurden ebenfalls die Kassetten der Vektoren pMLIReGFP und pMSIReGFP und des Markierungsvektors pTAGEGFP ausgeschnitten. Die Virusproduktion war in allen Fällen vergleichbar. Aufgrund dieser Experimente kann man schlussfolgern, dass der Aufbau des Austauschvektors pMLCMeGFP ungeeignet ist. Allerdings

bleibt die genaue Ursache für die Transkription des Reportergens ohne retrovirale Verpackung unklar.

Um die erzielten Titer mit einer nach Standardtechniken etablierten Virusproduzentenzelllinie zu vergleichen, wurden der Vektorer pMLIReGFP und der für die Puromycinresistenz kodierende Vektor pBSPac Δ P im Verhältnis 5:1 in die Verpackungszelllinie PT67 kotransfiziert. Die Zellen wurden mit Puromycin selektiert und willkürlich zwölf Einzelklone selektiert. Bereits unter dem Fluoreszenzmikroskop unterschieden sich die Klone hinsichtlich der GFP-Expression zum Teil deutlich. Da diese Methode zu einer zufälligen Integration mit unterschiedlichen Kopienzahlen führt, variierte die GFP-Expression sehr stark (nicht gezeigt). Zur genaueren Charakterisierung wurden die retroviralen Titer bestimmt. Das Ergebnis der Analyse ist in der Abbildung 2.19 B dargestellt. Nur zwei der zwölf vermessenen Klone produzierten mehr als $1 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h. Die übrigen Klone setzten sehr viel weniger Viren frei, drei davon sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Dies bestätigt, dass die Produktivität der randomisierten Integration stark schwankt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die isogenen Subklone der Masterzelllinie nach dem Kassettenaustausch mit pMSIReGFP, pMLIReGFP und pSINeGFP eine homogene Virusproduktion zeigen. Die dabei erzielten Titer sind für die getesteten Vektoren sehr gut. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das vorgestellte System nicht auf einen Promotor beziehungsweise LTR beschränkt ist, sondern durch die Verwendung optimierter Kassetten die Produktivität gesteigert werden kann.

2.4.4 Nachweis der Verpackung und Transduktion unspezifischer RNA durch Retroviren

Für die Transkription des Neomycinresistenzgens nach dem Kassettenaustausch wurde in dieser Arbeit neben einem CMV-Promotor ein EMCV-IRES-Element verwendet. In der Abbildung 2.16 ist die Funktion des IRES-Elements schematisch dargestellt. Die Transkription des retroviralen Vektors und des Selektionsmarkers wird über eine bicistronische mRNA gewährleistet. Dies beinhaltet allerdings auch die Möglichkeit, dass nicht nur die mRNA #1, also der eigentliche virale Vektor, sondern auch zusätzliche, außerhalb des 3'LTR gelegene Sequenz verpackt werden kann (mRNA #2).

Die Transduktion zusätzlicher Sequenzen ist ein natürliches Phänomen von Retroviren und beruht auf der Tatsache, dass die Polyadenylierung der viralen mRNA nicht bei allen Transkripten in der 3' R-Region erfolgt. Vielmehr gibt es Durchlesetranskripte, analog zu der mRNA #2 in Abbildung 2.16. Swain und Coffin (1992, 1993) gaben an, dass etwa 15% der viralen Transkripte Sequenzen aus dem Genom der Wirtzelle enthalten. Die in der vorgestellten Arbeit durch den Kassettenaustausch etablierten Klone enthalten, im Gegensatz zu zufällig integrierten Retroviren, einen definierten Bereich hinter dem 3' LTR, nämlich die Selektionskassette mit dem Neomycinresistenzgen. Es wurde daher überprüft, ob die bicistronische mRNA #2 von den Subklonen verpackt wird. Die virushaltigen Kulturüberstände von Subklonen der Vektoren pMLIREGFP und pMSIRcolVII wurden benutzt, um NIH3T3-Zellen zu infizieren. Die Infektanten wurden unter Selektionsdruck von G418 kultiviert. Aus der Anzahl der entstandenen Klone im Verhältnis zu den infizierten Zellen zeigte sich, dass etwa 0,01% der pMLIREGFP-Viren das *neo*-Gen transduzierten. Im Gegensatz dazu sank diese Zahl um das 100fache, wenn pMSIRcolVII-Viren für die Infektion verwendet wurden. Dieser Vektor wird im Kap. 2.4.5 beschrieben. Aufgrund der Anzahl der etablierten Subklone nach dem Kassettenaustausch (vgl. Abbildung 2.17 und Tabelle 2-4) kann man annehmen, dass die poly(A)-Sequenz im proviralen 3' LTR mit einer ähnlichen Effizienz überlesen wird. Vermutlich trägt aber die Größe der zu verpackenden RNA im Falle des Kollagenvektors zu der unterschiedlichen Verpackungseffizienz bei. Die Information, dass die Transduktion der mRNA #2 vom Austauschvektor abhängig ist, kann dazu verwendet werden zukünftige Austauschvektoren so zu modifizieren, dass die Möglichkeit der Verpackung zusätzlichen genetischen Materials ausgeschlossen wird (vgl. 3.6.4).

2.4.5 Herstellung eines therapeutischen Vektors

Nachdem die prinzipielle Eignung des Kassettenaustauschsystems für die Etablierung von neuen Verpackungszelllinien gezeigt war, sollte ein therapeutischer Vektor in die Masterzelllinie eingebracht und damit die Qualität des Systems getestet werden. Das humane KollagenVII wurde als therapeutisches Gen gewählt. Dieses Gen wurde in Modellsystemen erfolgreich zur Behandlung von Epidermolysis Bullosa (EB) eingesetzt. EB bezeichnet eine heterogene Gruppe von vererbten Hautkrankheiten, deren Krankheitsbild durch Blasenbildung auf der Haut und Schleimhautmembranen aufgrund kleinster Traumata gekennzeichnet ist (Bauer und Laimer, 2004). Weiterhin entwickeln betroffene Patienten häufig aggressive Karzinome (Woodley et al., 2004). Die Ursache einer Unterform von EB, der rezessiven dystrophen Epidermolysis Bullosa (RDEB), ist eine Nullmutation beider

KollagenVII-Allele. Die Mutation führt zu einer ungenügenden Verbindung zwischen Dermis und Epidermis und somit zu den beschriebenen Krankheitsbildern.

Der gentherapeutische Ansatz zur Behandlung von RDEB ist das Einbringen eines funktionellen KollagenVII-Gens in Hautzellen, idealerweise in die Kollagen-exprimierenden Keratinozyten oder deren Vorläuferzellen. So wurden Hautzellen von betroffenen Patienten erfolgreich mit verschiedenen Methoden transduziert (Woodley et al., 2004; Chen et al., 2002; Ortiz-Urda et al., 2002, 2003). Die auf immundefiziente Mäuse transplantierte Haut zeigte nach der Behandlung eine normale KollagenVII-Expression.

Die cDNA des humanen KollagenVII umfasst etwa 8,8 kb. Zanta et al. (im Druck) gelang es, diese große Sequenz in einen MSCV-basierenden retroviralen Vektor zu klonieren, mit welchem anschließend infektiöse Partikel generiert werden konnten. Da mit der Insertion des therapeutischen Gens das Verpackungspotential ausgeschöpft ist, konnte kein Selektionsmarker mehr integriert werden. Das klassische Screening nach hochtitrigen Produzentenzellen war somit äußerst aufwendig und langwierig. Tatsächlich konnten die Autoren keine hochtitrigen Zellen etablieren. Die Kassettenaustauschstrategie sollte eine Vermeidung dieser Prozedur möglich machen.

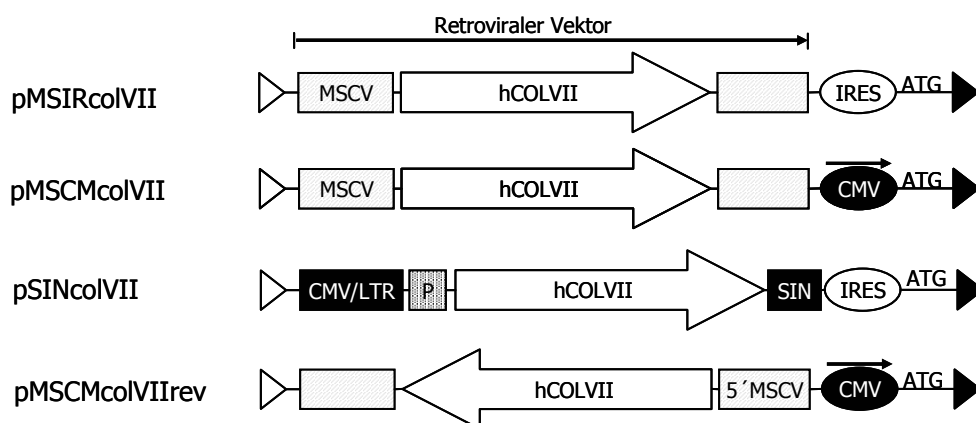


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der KollagenVII-transduzierenden retroviren Austauschvektoren. Als interner Promotor (P) des SIN-Vektors wurde ein EF-1 α -Promotor verwendet.

Für den Austausch wurde der KollagenVII-Vektor mit flankierenden FRT-Sequenzen und entweder einem CMV-Promotor oder einem IRES-Element versehen. Auch für diese Austauschexperimente wurde ein Vektor mit einer revers orientierten Kasette kloniert. Zusätzlich wurde ein SIN-Vektor konstruiert und mit einem IRES-Element ausgestattet. Der schematische Aufbau der Vektoren ist der Abbildung 2.20 dargestellt. Im SIN-Vektor übernimmt ein CMV-Promotor die Transkription der retroviralen Kasette. Durch die Deletion der U3-Region im 3' LTR kann der LTR nach reverser Transkription in den infizierten Zellen

nicht als Promotor fungieren. Die Transkription des Transgens (KollagenVII) wird darum vom internen EF-1 α -Promotor gesteuert.

Vektor	Austauscheffizienz [Anzahl der Subklone]	Klone analysiert/korrekt ausgetauscht
pMSIRcolVII	40 – 50	15/15
pMSCMcolVII	60 – 70	12/12
pSINcolVII	40 – 50	18/18

Tabelle 2-4: Austauscheffizienz der KollagenVII-transduzierenden retroviralen Vektoren.

Korrelierend mit den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Ergebnissen führte auch hier die Verwendung des reversen Vektors nicht zu einem Kassettenaustausch. Die möglichen Interferenzen zwischen dem CMV-Promotor und dem retroviralen LTR sind also nicht auf bestimmte Kassetten begrenzt, sondern können generell auf die Orientierung des retroviralen Vektors zurückgeführt werden.

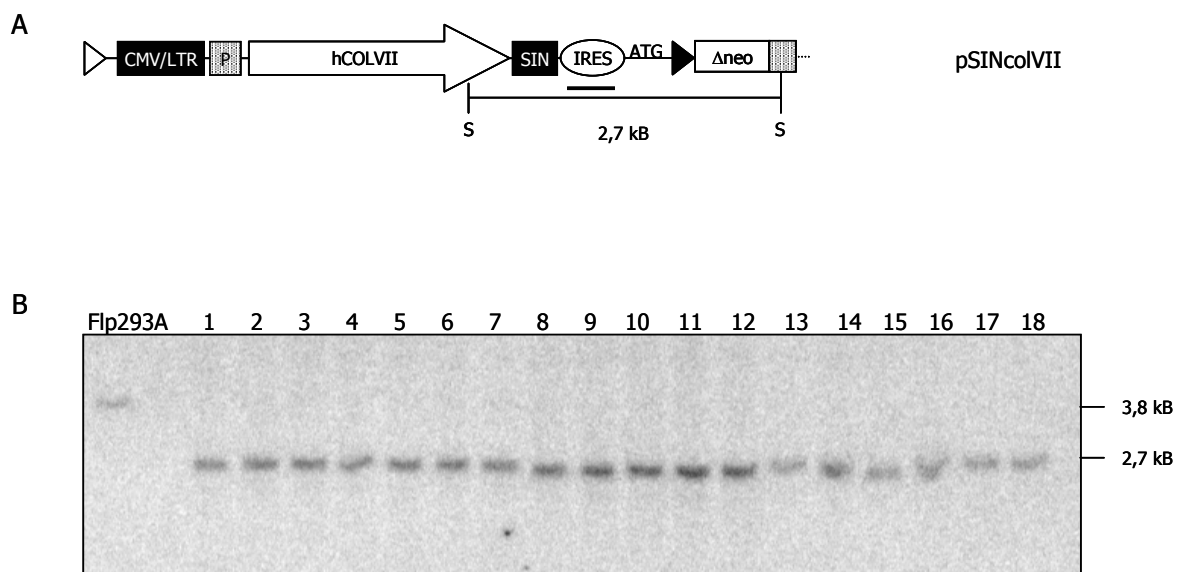


Abbildung 2.21: Southern Blot Analyse der Subklone nach Austausch mit pSINcolVII. A: Schematische Darstellung des Austauschvektors nach Integration in den markierten Locus der Masterzelllinie. S = *SacI*-Restriktionsstelle; Position der IRES-Sonde = schwarzer Balken. B: Southern Blot der Subklone 1 bis 18 und des Parentalklons Flp293A. Die mit *SacI* geschnittene chromosomale DNA wurde mit einer IRES-Sonde hybridisiert.

Im Gegensatz dazu war es möglich mit den Konstrukten pMSIRcolVII, pMSCMcolVII und dem SIN-Vektor pSINcolVII jeweils zwischen 40-70 Subklone zu generieren. Mehrere isolierte

Subklone je Vektor wurden mit dem Southern Blot Verfahren auf korrekten Kassettenaustausch überprüft. In der Tabelle 2-4 sind die Ergebnisse dieser Analyse zusammengefasst. Alle 45 analysierten Subklone zeigten die richtige Integration des therapeutischen Vektors. Anhand des Beispiels der pSINcolVII-Subklone ist der effiziente Austausch in der Abbildung 2.21 B gezeigt.

Die genomische DNA wurde mit *SacI* geschnitten und gegen das IRES-Element hybridisiert. Ein erfolgreicher Kassettenaustausch sollte in einer 2,7 kb Bande resultieren (Abbildung 2.21 A), während die DNA der Masterzelllinie ein 3,8 kb Fragment aufweisen sollte. Der Southern Blot zeigt die erwarteten Bandengrößen, außerdem lässt die Abwesenheit zusätzlicher Signale den Schluss zu, dass keine zufällige Integration des Austauschvektors im Genom der Subklone stattgefunden hat.

2.4.6 Der SIN-Vektor ermöglicht einen hohen und stabilen Titer

Für die weitere Charakterisierung wurden die Subklone der Austauschvektoren auf die Expression des integrierten Transgens KollagenVII überprüft. Zunächst wurden Zellen der Subklone auf Deckgläschen ausgesät und anschließend fixiert. Das KollagenVII wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 2.22 A). Dazu wurden ein primärer Antikörper gegen das humane KollagenVII und ein zweiter, FITC-markierter Antikörper verwendet. Die analysierten Subklone waren in der Färbung positiv, das heißt sie exprimierten Kollagen VII. Es konnten visuell keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Subklone beider Vektoren festgestellt werden.

Im Unterschied dazu zeigte keiner der Subklone des CMV-Vektors pMSCMcolVII ein Fluoreszenzsignal nach der Färbung, was bedeutet, dass sie Zellen kein KollagenVII exprimierten. Parallel zu den Ergebnissen des Kassettenaustauschs mit dem CMV-Vektor pMLCMeGFP (Kap. 2.4.3) wurden keine Viren freigesetzt. Die Verwendung des CMV-Promotors für die Neo-Transkription zeigt also, unabhängig von dem zu transduzierenden Gen, mehrere Stufen einer Interferenz. Während die reverse Orientierung der Kasette keinen Austausch zulässt, unterbindet in den 5'-3'-orientierten Kassetten der CMV-Promotor die Virusproduktion. Der Kassettenaustausch mit pMSCMcolVII zeigte eine weitere Möglichkeit der Interferenz. In diesem Fall wurde, anders als bei den Subklonen von pMLCMeGFP, auch die Expression des Transgens in der Produktionszelle unterbunden.

Die Möglichkeit Kollagen-exprimierende Zellen mittels Immunfluoreszenz anzufärben, ließ die Bestimmung des retroviralen Titters der Subklone zu. Dazu wurden Verdünnungen des Kulturüberstandes auf NIH3T3-Zellen gegeben. Nach 48h wurden die auf Deckgläschen

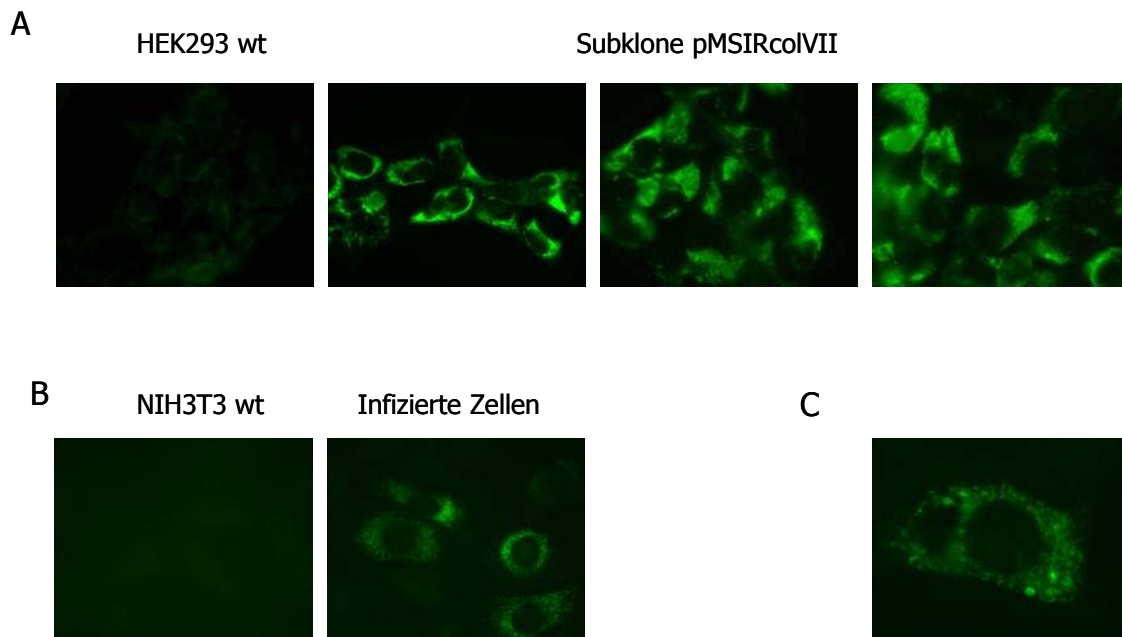


Abbildung 2.22: Immunfluoreszenzfärbung von KollagenVII. A: obere Reihe: Subklone nach Kassettenaustausch mit pMSIRcolVII. B: Mit Überständen der pMSIRcolVII-Subklone infizierte NIH3T3-Zellen. C: Vergrößerung einer infizierten Zelle. Für die Färbung wurde ein mAK gegen humanes KollagenVII und ein sekundärer, FITC-markierter AK verwendet. Als Kontrollen dienten HEK293 wt und NIH3T3 wt Zellen.

fixierten Zellen mit den beiden Antikörpern inkubiert und die positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Abbildung 2.22 B). Für die Subklone nach dem Austausch mit pMSIRcolVII konnte ein retroviraler Titer von $1,2 \cdot 10^5$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h errechnet werden (Tabelle 2-5).

Klone	Retroviraler Titer [iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h]
- pMSIRcolVII	$1,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$
- pSINcolVII	$1,2 \cdot 10^6 \pm 2,0 \cdot 10^5$

Tabelle 2-5: Retroviraler Titer nach Kassettenaustausch mit den KollagenVII-Vektoren.

Eine Verbesserung des Titters wurde durch den Einsatz der SIN-Kassette im Vektor pSINcolVII erzielt. Die Überstände 6 korrekt ausgetauschter Subklone wurden für eine Messung herangezogen und Titer von $1,2 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h bestimmt, wobei die

Abweichungen zwischen den Subklonen $2,0 \cdot 10^5$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h betrug. Die Produktion von KollagenVII-transduzierenden Retroviren ist also 10fach höher in Subklonen mit dem SIN-Vektor. Allerdings besteht aufgrund der Bestimmungsmethode auch die Möglichkeit, dass nur die Zellen ausgezählt wurden, deren KollagenVII-Expression nach der Infektion einen bestimmten Schwellenwert überschritten hatte, der nötig ist, um ein erkennbares Fluoreszenzsignal herbeiführen. Im Falle des SIN-Vektors könnte eine stärkere Expression durch den humanen EF-1 α -Promotor eine scheinbar größere Anzahl an positiven Zellen hervorrufen.

Zur Überprüfung der Stabilität der Virusproduktion wurden die Subklone ohne Selektionsdruck für 8 Wochen kultiviert und die retroviralen Titer mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Die spezifische Produktivität blieb über den gesamten Zeitraum des Experiments stabil bei etwa $1,2 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h.

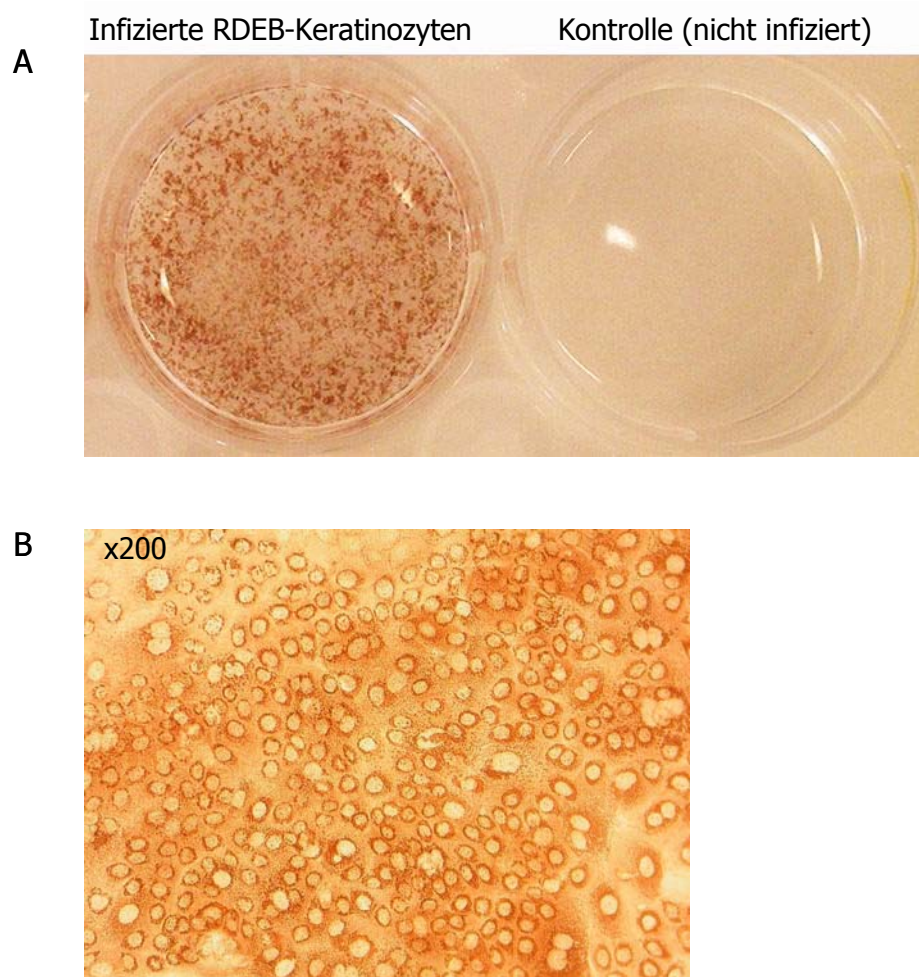


Abbildung 2.23: Immunzytochemische Färbung von Keratinocyten aus RDEB-Patienten. A: Linke Platte: Infizierte Keratinocyten; rechte Platte: nicht infizierte Keratinocyten. B: Vergrößerung (200x) der infizierten Keratinocyten.

Es wurde überprüft, ob die produzierten SIN-Vektoren in relevanten Zielzellen einer Gentherapie die Expression von KollagenVII ermöglichen. Dies erfolgte im Labor von M. Titeux (Toulouse, Frankreich). Hautzellen von RDEB-Patienten wurden isoliert und kultiviert. Diese Zellen sind durch eine völlige Abwesenheit der KollagenVII-Expression gekennzeichnet. Für die Transduktion wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen mit Virusüberstand eines pSINcolVII-Subklons inkubiert. Die Expression des KollagenVII wurde nach zwei Tagen immunzytochemisch analysiert. In der Abbildung 2.23 A ist das Ergebnis der Analyse dargestellt. Auf der linken Platte sind pSINcolVII-infizierte RDEB-Keratinocyten zu sehen. Etwa 80–90% der Zellen konnten als Resultat einer erfolgreichen Transduktion gefärbt werden. Die Kontrollplatte auf der rechten Seite zeigt nicht infizierte RDEB-Keratinocyten. Die Vergrößerung infizierter Zellen im Teil B der Abbildung lässt das exprimierte KollagenVII um den hellen Zellkern deutlich erkennen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Kassettenaustauschstrategie eine Etablierung von Virusproduzenten mit hohen und vorhersagbaren Titern erlaubt. Die Selektion der ausgetauschten Subklone erfolgte schnell und effizient innerhalb von etwa 2-3 Wochen nach der Transfektion. Diese neue Methode zur Etablierung von Verpackungszellen vermeidet ein langwieriges Screening vieler Transfektanten. Am Beispiel von KollagenVII konnte gezeigt werden, dass so die Isolierung hochtitriger Klone möglich ist, auch wenn das Transgen nicht direkt nachzuweisen ist und als Selektionsgen verwendet werden kann, oder wenn die Größe des therapeutischen Gens keine zusätzliche Verpackung von Selektionsmarkern erlaubt. In einem abschließenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die von Subklonen der Masterzelllinie Flp293A freigesetzten Retroviren eine erfolgreiche Transgenexpression in potentiellen Zielzellen für Gentherapieversuche ermöglichen.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine „Tag-und-Targeting-Methode“ etabliert, welche das Auffinden und die Wiederverwendung von besonders geeigneten chromosomalen Loci ermöglicht. Dies sollte in drei Zelllinien getestet werden. Die Markierung der Loci erfolgte durch einen retroviralen Markierungsvektor. Dieser kodiert für das Reportergen eGFP, dessen Expression für eine Anreicherung und Isolierung von hochexprimierenden Klonen mittels Durchflusszytometrie verwendet werden konnte. Nach der Etablierung von sogenannten Parentalklonen erfolgte dann der Austausch der Markierungskassette gegen neue Expressionskassetten durch Flp-katalysierte, sequenzspezifische Rekombination (RMCE). Es wurde untersucht, ob die auf diese Weise generierten Integrationsorte für eine vorhersagbare Proteinexpression (Antikörperproduktion), sowie die Produktion von therapeutischen Retroviren geeignet sind. Für den Kassettenaustausch wurden unterschiedliche Konstrukte verwendet.

Im Folgenden sollen die erzielten Ergebnisse diskutiert und das Kassettenaustauschsystem hinsichtlich einer Anwendung zur Produktion von rekombinanten Proteinen oder therapeutischen Viren bewertet werden.

3.1 Markierung von chromosomalen Loci und Stabilität des proviralen Vektors

Retrovirale Integrationsorte befinden sich oft in der Nähe von CpG-Inseln und DNaseI-hypersensitiven Regionen (Fincham und Wyke, 1991; Rodewohld et al., 1987). Diese „offenen“ Chromatinstrukturen sind Indikatoren für transkriptionell aktive Gene. Mielke et al. (1996) konnten zeigen, dass Retroviren in der Umgebung von SAR-(*scaffold attached region*) Elementen integrieren. SAR-Elemente binden an die Kernmatrix und steigern die Genexpression von nahen Promotoren (Klehr et al., 1991). Durch eine genaue Kartierung von mehr als 1000 retroviralen Integrationsorten durch Wu et al. (2003), konnte die Präferenz für transkribierte Abschnitte des Genoms bestätigt werden. Eine solche Präferenz unterstützt zum einen die Transkription des Virus und damit auch des transduzierten Transgens, aber auch die Stabilität der Genexpression. Baer et al. (2000) verglichen die Expression eines retroviralen Vektors nach Infektion und nach Elektroporation. Das Ergebnis war eine stabilere und höhere Expression der infizierten Kasette. Obwohl Hansen et al.

(2003) zeigen konnten, dass auch transfizierte Expressionsvektoren Präferenzen für genomische Loci haben können, sind die genauen Mechanismen und notwendigen Komponenten für eine „Hot Spot“-Integration in aktive Chromosomenbereiche nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorgestellten Arbeit Retroviren zum Auffinden von hochexprimierenden chromosomalen Loci eingesetzt.

Der retrovirale Markierungsvektor pTAGEGFP wurde für die Infektion der Zelllinien CHO-K1, BHK-21 und HEK293 verwendet. Die retrovirale Markierung wurde unter Bedingungen durchgeführt, welche die Integration einer Einzelkopie des Vektors bevorzugt (MOI = 0,01). Die Expressionsleistung einer Zelllinie mit einer Einzelkopie der Expressionskassette spiegelt die Eigenschaften der Kassette und der chromosomalen Umgebung der Integrationsstelle wider. Unter Verwendung des eGFP-Reportergens war es möglich hochexprimierende Zellen zu isolieren. Dafür wurden zunächst die infizierten Zellen mit Hygromycin selektiert und dann mittels Durchflusszytometrie (FACS) Klone sortiert.

Die Stabilität der Expression einer Zelllinie ist ein wichtiges Kriterium für die spätere Produktion von rekombinanten Proteinen (Barnes et al., 2003). Da die vorgestellte Strategie stabil exprimierende Klone erfordert, wurden die retroviral markierten Zellpopulationen als auch isolierte Klone der jeweiligen Zelllinie einem Stabilitätstest unterzogen.

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der bicistronische Aufbau eines retroviralen Markierungsvektors mit nur einem Promotor für die stabile Expression des Reportergens geeignet ist (Verhoeyen et al., 2001). Auch Ghattas et al. (1991) und Wiznerowicz et al. (1997) berichten von der effizienten Expression zweier Gene in einem retroviralen Vektor, gesteuert durch viralen LTR-Promotor und IRES-Element. Eine stabile Expression konnte auch in dieser Arbeit an den markierten BHK-21 und HEK293-Zellpopulationen als auch bei den isolierten Parentalklonen nachgewiesen werden (Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3).

3.2 Effizienz des Kassettenaustauschs

3.2.1 Die Kombination von heterologen FRT-Sequenzen und Selektionsfalle führt zu 100% Austauscheffizienz

Der in dieser Arbeit durchgeführte Kassettenaustausch basiert auf dem FLP/FRT-Rekombinasensystem aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Durch die Verwendung zweier verschiedener FRT-Sequenzen ist nur ein Austausch der proviralen Kassette gegen eine neue

Expressionskassette möglich, da wildtyp und mutierte FRT-Sequenzen nicht mehr miteinander rekombinieren können (Schlake und Bode, 1994; Seibler und Bode, 1997). Karremann S. et al. (1996) verwendeten, analog zu dieser Arbeit, die heterologen FRT-Sequenzen mit der Tandemanordnung in der U3-Region der 3'LTR. Es wurde ein Puromycinselektionsmarker in einen retroviralen Vektor kloniert, dessen Transkription vom 5'LTR gesteuert wird. Ein Negativselektionsmarker im „backbone“ des Vektors wurde für eine Selektion gegen zufällige Integrationen eingefügt. Für zwei provirale Integrationsorte konnten 62 Klone nach kombinierter Positiv- und Negativselektion etabliert werden, aber nur 1 Klon zeigte sequenzspezifische Rekombination. Stattdessen wurden vielfach Zufallsintegrationen des Austauschvektors detektiert.

Eine Verbesserung dieser geringen Austauscheffizienz wurde durch die Kombination von heterologen FRT-Sequenzen mit einem nicht funktionellen Selektionsmarker (Δneo) erreicht, welcher nur durch korrekten Kassettenaustausch aktiviert werden kann. Verhoeyen (2000) benutzte verschiedene Austauschvektoren mit einem CMV-Promotor oder einem IRES-Element für die Steuerung der Transkription des Neomycinresistenzgens. Insgesamt wurden 165 Subklone nach Kassettenaustausch überprüft und als korrekt ausgetauscht identifiziert. Dies bedeutet, dass alle G418-resistenten Klone die sequenzspezifische Integration der Austausch-kassette zeigten. Diese Arbeiten belegen die Vorteile des verwendeten Kassettenaustauschsystems mit einer „Selektionsfalle“.

Durch die Benutzung von verschiedenen loxP-Sequenzen, gekoppelt mit einem Selektionssystem konnten Bethke und Sauer (1997) und Bouhassira et al. (1997) ebenfalls nahezu 100% Austauscheffizienz nachweisen. Die Kombination des Austauschsystems mit einem Selektionsmarker, idealerweise einer „Markerfalle“, garantiert also einen effizienten Kassettenaustausch.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Kassettenaustauschsystem auf verschiedene Zelllinien anwendbar ist. Insgesamt wurde ein erfolgreicher Kassettenaustausch mit den in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukten an 122 Subklonen der Zelllinien HEK293, BHK-21 und CHO-K1 nachgewiesen. Nur drei Subklone wiesen die zusätzliche Integration eines Austauschvektors auf. Mit Ausnahme der reversen retroviralen Vektoren pMLCMeGFP_{rev} und pMSCMcolVII_{rev} konnten mit allen Austauschvektoren Subklone etabliert werden, sodass man den Kassettenaustausch als hocheffizient bezeichnen kann.

Basierend auf der Anzahl der ausgesäten Zellen in den Austauschexperimenten und der erhaltenen Subklone konnte je nach Zellart und verwendetem Vektor ein Kassettenaustausch in etwa 0,02% der Zellen beobachtet werden. Weiterhin konnten die Beobachtungen von Verhoeyen (2000) bestätigt werden, dass die Austauschfrequenz für verschiedene hochexprimierende retrovirale Integrationsorte einer Zelllinie ähnlich gut ist. Verhoeyen

zeigte, dass gering exprimierende Zellen gleichermaßen schlecht für einen Austausch geeignet sind. Hochexprimierende Zellen hingegen wiesen einen guten Zugang für die sequenzspezifische Rekombination auf. Die Isolierung von transkriptionell starken Loci im „offenen“ Chromatin unterstützt also auch den Erfolg des Kassettenaustauschs. Ein wichtiger Faktor für die praktische Anwendung der Austauschstrategie ist die relativ kurze Zeit, welche für die Etablierung der Subklone benötigt wird. In Abhängigkeit von der Zelllinie konnte nach 14 bis 21 Tagen die Expansion der Subklone begonnen werden. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden zur Generierung von Produzentenzellen.

3.2.2 Die Konstruktion des Austauschvektors beeinflusst die Aktivierung des Neomycinresistenzgens und die Expression der Austauschkassette

Sowohl für die Produktion rekombinanter Antikörper als auch für die Herstellung retroviraler Vektoren wurden verschiedene Austauschvektoren entwickelt und auf ihre Austauscheffizienz getestet. Dabei stellt sich heraus, dass bestimmte Anordnungen der Vektorelemente maßgeblichen Einfluss auf den Kassettenaustausch haben, ja sogar hinderlich sein können. So zeigte sich, dass die reverse Orientierung der retroviralen Kassette in den Plasmiden pMLCMeGFP_{rev} (Kap. 2.4.2) und pMSCMcolVII_{rev} (Kap. 2.4.5) nicht für die sequenzspezifische Rekombination geeignet sind. Es konnten keine Subklone etabliert werden.

Für die Expression des Neomycinresistenzgens nach dem Kassettenaustausch wurden zwei verschiedene Prinzipien angewendet: Entweder ein IRES-Element oder ein CMV-Promotor. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass beide geeignet sind die Herstellung des Selektionsmarkers zu gewährleisten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Subklone welche mit dem CMV-Promotor ausgestattet wurden (pMLCMeGFP und pMSCMcolVII) keine Retroviren produzierten. Auch konnte in den pMSCMcolVII-tragenden Subklonen keine KollagenVII-Expression nachgewiesen werden. Da die Integrität der retroviralen Kassette in allen Subklonen dokumentiert wurde, sind wahrscheinlich Interferenzen zwischen dem viralen LTR und dem CMV-Promotor verantwortlich für diese Beobachtungen. Dies gilt vermutlich auch für die Austauschvektoren mit der reversen Expressionskassette, in welchen ebenfalls CMV-Promotoren zum Einsatz kamen.

Obwohl retrovirale Vektoren mit einem internen Promotor in der Forschung und in Gentherapieversuchen erfolgreich sind (Sun et al., 2000; Kaleko et al., 1990), gibt es

Berichte über Interferenzen zwischen LTR und verschiedenen Promotoren, beispielsweise dem Tymidinkinasepromotor (Emerman und Temin, 1984, 1986), dem SV40-Promotor (Hoeben et al., 1991; Treisman et al., 1995) dem Maus Albumin- und dem PolymeraseII-Promotor (Wu et al., 1996). In einem Ansatz verwendeten Verhoeven et al. (2001) einen retroviralen Markierungsvektor mit einem internen CMV-Promotor für die Transkription eines Selektionsmarkers. Die markierten Parentalklone waren durch eine instabile und niedrige Expression des LTR-gesteuerten Reportergens gekennzeichnet. Diese Eigenschaft wurde durch den Kassettenaustausch gegen einen Ein-Promotor-Vektor mit einem IRES-Element in eine hohe und stabile Expression verändert. Diese Ergebnisse korrelieren mit vergleichenden Studien der beiden Vektortypen, in denen gezeigt wurde, dass die Nutzung eines IRES-Elements effizienter als ein Zwei-Promotor-System ist (Ghattas et al., 1991; Wiznerowicz et al., 1997; Treisman et al., 1995).

Basierend auf den vorliegenden Daten und den Ergebnissen, welche mit beiden Vektortypen in dieser Arbeit erzielt wurden, ist bicistronischen Austauschvektoren der Vorzug gegenüber Vektoren mit einem internen CMV-Promotor zu geben.

Einen weiteren Hinweis auf eine konstruktionsabhängige Aktivierung des Neomycinresistenzgens lieferten die Daten der Antikörpervektoren (Kap. 2.3.1). Die Auszählung der Klone nach dem Kassettenaustausch ergab, dass die Anordnung der beiden Antikörperketten in der Expressionskassette die sequenzspezifische Rekombination beeinflusst. Während für pAK1 unabhängig von der Zelllinie und dem Integrationsort die höchsten Klonzahlen bestimmt wurden, führte der Einsatz von pAK4 zu einer 20-40fach geringeren Ausbeute. In beiden Vektoren übernimmt der adenovirale Promotor AdMLP die Transkription einer bicistronischen mRNA in die gleiche Richtung. Allerdings setzt diese sich einmal aus der schweren Kette und dem Neomycinresistenzgen und für den anderen Vektor aus der leichten Kette und dem Selektionsmarker zusammen. Hennecke et al. (2001) zeigten, dass die Natur des ersten Cistrons in einem bicistronischen Konstrukt maßgeblichen Einfluss auf die Translation des zweiten Cistrons hat. Im vorliegenden System verläuft die Translation des Neomycinphosphotransferasegens über das zweite Cistron. Es ist demnach möglich, dass der Kassettenaufbau des Vektors pAK4 zu einer geringen Translationseffizienz der Neomycinphosphotransferase führt.

Da ein vergleichbares System noch nicht für das Kassettenaustauschverfahren beschrieben wurde, können die Gründe für die Unterschiede in der Austauscheffizienz nur vermutet werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass ebenfalls Interferenzen zwischen den benachbarten Promotoren eine wesentliche Ursache darstellen.

3.3 *Homogene und vorhersagbare Expression der isogenen Subklone*

Die isogenen Subklone eines Integrationsortes sollten nach dem Kassettenaustausch ein uniformes Expressionsmuster aufweisen. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten an CHO und HeLa-Zellen (Wong et al., 2005), murinen Erythroleukämiezellen (Feng et al., 1999), BHK-Zellen (Schübeler et al., 1998) und murinen Fibroblasten (Verhoeven et al., 2001) gezeigt.

Nach dem Kassettenaustausch mit einem β -Galaktosidasevektor konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass alle Zellen von HEK293 und BHK-21-Subklonen das Reportergen exprimieren (Abbildung 2.7). Dies unterstreicht die Übertragbarkeit des vorgestellten Systems auch auf andere Zelllinien. Die quantitative Analyse der β -Galaktosidaseaktivität in den Zellen ergab, dass die Subklone eines Parentalklons nahezu identische Expressionen lieferten (Abbildung 2.8). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Homogenität der Expression auch mit anderen Transgenen nachgewiesen. So ist die Produktion von Antikörpern der Subklone eines Integrationsortes ebenso einheitlich wie die retroviralen Titer der Subklone nach dem Kassettenaustausch (vgl. Abbildung 2.11 B und Abbildung 2.19).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die beschriebene Austauschstrategie zu hochexprimierenden Zelllinien führen kann. In Abhängigkeit vom Aufbau des Austauschvektors wurden ebenso hochexprimierende wie auch stabile Zellen generiert. Der Kassettenaustausch der GFP-transduzierenden Retroviren ermöglicht einen direkten Vergleich der Expression von Parental- und Subklon. Die hohe spezifische Produktivität der Masterzelllinie Flp293A wurde von den meisten der ausgetauschten Subklone erreicht und sogar übertroffen (Tabelle 2-3). Eine gut charakterisierte genomische Integrationsstelle kann also die *vorhersagbare* Expression neu integrierter Transgene vermitteln. Allerdings muss gezielt nach Loci gesucht werden, die eine stabile Expression gewährleisten können. Liu et al. (2006) konnten mit der kommerziell erhältlichen Zelllinie Flp-In-293 zeigen, dass die Expression der isogenen Subklone nach der Integration von Reporterkassetten keinesfalls homogen war und ohne Selektionsdruck verloren ging. Obwohl die Markierung dieser Zelllinie mittels Transfektion durchgeführt wurde, ist es möglich, dass auch retroviral markierte Loci keine stabile Expression unterstützen.

3.4 Besonderheiten der CHO-K1-Zellen

3.4.1 Die retrovirale Markierung mit pTAGeGFP führt zu einer geringen Diversität der Parentalklone

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass sich das Kassettenaustauschsystem auf Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs anwenden lässt. Trotzdem ist die Nutzung von CHO-K1-Zellen mit Einschränkungen verbunden. Die Zelllinie wurde für diese Arbeit ausgewählt, weil die Produktion von rekombinanten Proteinen in CHO-Zellen gut dokumentiert und etabliert ist und die Eignung für die Ko-Expression von Fremdgenen bewiesen wurde (Kaufman et al., 1989; Israel und Kaufman, 1989; Kaetzel und Nilson, 1988; Bianchi und McGrew, 2003). Zudem benutzten in den vergangenen Jahren immer mehr Biotechnologieunternehmen CHO-Zellen für die Produktion von monoklonalen Antikörpern.

Bereits die Markierung von chromosomalen Loci zeigte deutliche Unterschiede zwischen CHO-K1-Zellen und den anderen beiden Zelllinien. Etwa 90-100% der isolierten Klone wiesen innerhalb eines Infektionsexperiments identische Bandenmuster bei der Detektion von Randfragmenten in der Southern Blot Analyse auf (vgl. Abbildung 2.5). Solche identischen Muster konnten in drei unabhängigen Experimenten beobachtet werden. Obwohl erst eine Sequenzierung der Integrationsstellen genaue Aussagen erlaubt, lässt die Southern Blot Analyse die Vermutung zu, dass die Diversität der isolierten Klone sehr gering ist, also nur wenige unabhängige Integrationsorte isoliert wurden.

Zu der geringen Diversität der CHO-K1-Klone trug möglicherweise die vergleichsweise geringe Infizierbarkeit bei, selbst bei Verwendung der effizientesten Viren (Tabelle 2-1). Die Infektionseffizienz der BHK-Zellen war zwar ebenfalls gering, dennoch gibt es zwischen den beiden Hamsterzelllinien Unterschiede. BHK-Zellen stammen aus dem Syrischen Hamster, welcher dem Genus *Mesocricetus* angehört. CHO-Zellen hingegen wurden aus der Spezies *Cricetulus griseus* isoliert (Wilson et al., 1991). Der Unterschied der Ursprungsspezies wird bereits durch die Infizierbarkeit mit den verwendeten Viren widerspiegelt. Während CHO-Zellen nur von PG13 und PT67-Viren infiziert wurden, welche den Pit-1-Rezeptor für den Zellkontakt nutzen, konnten nur Ψ 2-Viren in die BHK-Zellen eindringen, eine Erscheinung, die von Karreman et al. (1996) in dem hier verwendeten Subklon BHK-21-A beobachtet und in dieser Arbeit bestätigt wurde. Ψ 2-Viren nutzen den mCat-Rezeptor für den Virus-Wirtszelle-Kontakt.

Die geringe Infektionseffizienz reicht allerdings nicht aus das beobachtete Phänomen zu erklären, da die verwendeten BHK-21-Zellen, welche eine ähnlich geringe Infektionseffizienz aufwiesen, nicht betroffen waren. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass das Provirus in vielen CHO-K1-Klonen nicht stabil war (Kap. 2.2.4). CHO-Zellen sind dafür bekannt, aufgrund von Translokationen und Chromosomen-„*Rearrangements*“ einen instabilen Karyotyp zu haben (Barnes et al., 2003). Durch die Southern Blot Analyse konnte auf einen Verlust des Neomycinresistenzgens in 9 von 17 Klonen eines Infektionsexperiments geschlossen werden (Abbildung 2.5 B). Ebenso wahrscheinlich wäre aber auch der Verlust des GFP-Reportergens oder des Hygromycinresistenzgens. In beiden Fällen ist es dann nicht möglich diese Zellen zu isolieren und die Anzahl markierter Parentalklone wird zusätzlich reduziert. Sowohl die geringe Infizierbarkeit als auch potentielle genetische Veränderungen können dazu führen, dass nur wenige markierte Klone mit einem Wachstumsvorteil durchwachsen. Diese bildeten schließlich die Population aus denen die Parentalklone isoliert werden sollten.

An dieser Stelle soll eine weitere Möglichkeit für die identischen Integrationsorte einer Infektion diskutiert werden.

Die Integration von Retroviren ist kein zufälliges Ereignis (Holmes-Son et al., 2001; Wu et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die zentrale Kerndomäne der retroviralen Integrase eine wichtige Rolle in der Integrationsspezifität hat (Shibagaki und Chow, 1997). Die Effizienz, mit welcher ein Locus für die virale Integration bevorzugt wird, hängt von mehreren Faktoren ab, wie der Transkriptionsaktivität (Weidhaas et al., 2000), DNaseI Hypersensitivität (Vijaya et al., 1986), Methylierung (Kitamura et al., 1992), GC-Gehalt (Leclercq et al., 2000), „scaffold attachment“-Nähe (Mielke et al., 1996), Nukleosomenstruktur (Pruss et al., 1994) und der DNA-Struktur höherer Ordnung (Katz et al., 1998). So ist es möglich, dass die Integration eines Retrovirus 280mal häufiger in bestimmten Loci statt findet, als es zufällig möglich wäre (Withers-Ward et al., 1994). Es ist vorstellbar, dass bestimmte zelluläre Faktoren, die in den HEK293 und BHK-21-Zellen nicht wirken oder vorhanden sind, zu „Hot Spot“-Integrationen in den CHO-K1-Zellen führen und das Spektrum erreichbarer Loci einengen. Der Nachweis, dass alle isolierten Klone den gleichen Integrationsort besitzen, müsste allerdings erst durch eine Sequenzierung der Randfragmente erbracht werden.

3.4.2 CHO-K1-Klone zeigen eine instabile Expression vor und nach dem Kassettenaustausch

Sowohl für BHK-21 als auch für die HEK293-Zellen konnten hochexprimierende und stabile Klone durch die Verwendung der Durchflusszytometrie isoliert werden. Abweichend von diesen Ergebnissen zeigten die infizierten CHO-K1-Zellgemische einen erheblichen Verlust an eGFP-Expression (Abbildung 2.2). Da dieselbe Markierungskassette erfolgreich in HEK293 und BHK-21-Zellen verwendet wurde, müssen Eigenschaften der CHO-K1-Zellen für diese Abweichung verantwortlich sein.

Unproduktive Zellen können einen Wachstumsvorteil gegenüber stark exprimierenden Zellen haben. In einem Zellgemisch, das ohnehin nur aus wenigen unterschiedlich markierten Klonen besteht, könnten die niedrig GFP-exprimierenden Zellen schnell durchgewachsen oder die Expression abschalten, um einen Wachstumsvorteil zu gewinnen. Dieses Durchwachsen von unproduktiven Zellen konnte durch Bae et al. (1995), Chuck und Palsson (1992), Frame und Hu (1990) und Lee et al. (1991) an Hybridomazellen gezeigt werden. Weiterhin beschrieben Bacsi und Weijksnora, (1986), Yoshikawa et al. (2000), Pallavicini et al. (1990), Fann et al. (2000), Weidle et al. (1988) und Kim S. J. et al. (1998) einen solchen Verlust an Expression von verschiedenen Transgenen ohne Selektionsdruck in CHO-Zellen.

Eine weitere Besonderheit der verwendeten CHO-K1-Zellen konnte nach dem Kassettenaustausch beobachtet werden. Die vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung des Vektors pTAREMCV zu einer homogenen β -Galaktosidaseexpression in BHK-21 und HEK293-Subklonen führte (Abbildung 2.7 und Abbildung 2.8). In diesem Vektor unterliegt die Transgenexpression der Kontrolle des LTR-Promotors. Alle Zellen der Subklone zeigten eine gleichmäßige blaue Färbung nach Behandlung mit dem Substrat X-Gal. Im Gegensatz dazu wurde in den 6 CHO-K1-Subklonen eine sogenannte Mosaikexpression beobachtet, das heißt nur etwa 10 bis 80% der Zellen eines Subklons konnten im β -Galaktosidaseassay blau gefärbt werden. Das Ausbleiben einer Farbreaktion in einem Teil dieser Zellen lässt auf ein Abschalten der Genexpression der Austausch-kassette schließen. Dieses „Silencing“ könnte zwei Ursachen haben: i) Ein Verlust der Transkription als Folge von Translokation oder Veränderungen der DNA-Sequenz, oder ii) Das Abschalten der Transkription aufgrund von epigenetischen Veränderungen (z.B. DNA-Methylierung) (Paulin et al., 1998). Durch die Southern Blot Analyse konnte kein Hinweis auf eine Deletion der Kassette gefunden werden. Dies bedeutet, dass nicht Sequenzverluste der ausgetauschten Kassette für den Expressionsverlust verantwortlich waren.

Bereits vor 25 Jahren wurde gezeigt, dass die Expression von MLVs nach Infektion von embryonalen Stammzellen und transgenen Mäusen abgeschaltet wird (Teich et al., 1977; Speers et al., 1980; Jahner et al., 1982). Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Abschalten auf transkriptioneller Ebene ablief und dass DNA-Methylierung in diesen Prozess involviert ist (Jahner et al., 1982; Stewart et al., 1982; Simon et al., 1983). Hoeben et al. (1991) infizierten ebenfalls mit einem β -Galaktosidase-kodierenden MLV murine Fibroblasten. Analog zu der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien mit einer Einzelkopie des retroviralen Vektors verwendet. Abhängig vom Ort der Virusintegration, also dem „Positionseffekt“, exprimierten zwischen 8 und 98% der Zellen das Reporterprotein. Hoeben et al. schlußfolgerten in ihrer Arbeit, dass die Mosaikexpression die Folge von Methylierungen des retroviralen LTR ist. Die Behandlung der Zellen mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin (azaC) bewirkte eine Revertierung des „Silencings“ und eine starke Zunahme der Anzahl an blau gefärbten Zellen.

Die Analogie der Ergebnisse von Hoeben et al. zu der vorgestellten Arbeit lässt darauf schließen, dass DNA-Methylierung zu den beobachteten Expressionsmustern beigetragen haben könnte. Die Unterschiede in den verschiedenen Zelllinien lassen sich durch eine höhere Wahrscheinlichkeit des „Silencings“ des retroviralen LTR in CHO-K1-Zellen erklären. Da für die Austauschexperimente nur ein CHO-K1-Parentalklon zur Verfügung stand, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Integrationsorte keine oder nur geringe Affinität zum Abschalten der Transkription haben. Die Analyse weiterer Klone könnte darüber Aufschluss geben.

Kürzlich wurde eine Methode beschrieben, welche das „*silencing*“ der Transkription in CHO-Zellen erfolgreich unterbindet. Williams et al. (2005) klonierten DNA Fragmente aus dem humanen HNRPA2B1-CBX3-Locus vor eine Expressionskassette. Diese Fragmente enthalten CpG-Inseln und umgeben Promotoren welche die Transkription von „housekeeping“ Genen steuern. Es konnte gezeigt werden, dass Fragmente zwischen 1,5 und 8,0 kb aus diesem Locus eine Steigerung der Transgenexpression sowie eine hohe Expressionsstabilität verursachen.

Aldrich et al. (2003) verwendeten neuartigen EASE-Vektoren zur Produktion von Antikörpern in CHO-Zellen. Diese unterschieden sich von herkömmlichen Expressionsvektoren durch den Einbau von sogenannten expressionssteigernden Sequenzelementen (*expression augmenting sequence elements*: EASE) vor die Promotoren der Antikörperketten und konnten die Expressionshöhe als auch die Stabilität der Genexpression steigern. Das EAS-Element wurde aus einer DNA-Bank von CHO-Zellen isoliert. Eine transformierte CHO-Zelllinie, welche hohe Expressionslevel von TNFrFc zeigte, wurde für die Herstellung der DNA-Bank ausgewählt, da sich herausstellte, dass die hohe Expression das Resultat einer Einzelintegration der TNFrFc-

Kassette war. Einem 14,5 kb Fragment im 5'-Bereich der Expressionskassette wurden die expressionssteigernden Eigenschaften zugeschrieben, die für die Produktion von monomeren und dimeren Proteinen bestätigt worden sind (Morris et al., 1997; Aldrich et al., 1998). Allerdings sind die genauen Mechanismen der Wirkweise dieses Elements nicht geklärt. Dennoch könnte basierend auf diesen Ergebnissen durchaus versucht werden, solche „Schutzschilder“ in zukünftigen Austauschvektoren nutzbar zu machen.

3.5 Die Produktion von rekombinanten Antikörpern

Die heute eingesetzten therapeutischen Antikörper können in zwei Generationen eingeteilt werden (Haurum und Bregenholt, 2005). Antikörper aus dem menschlichen Blut repräsentieren die erste Generation therapeutischer Antikörper und zeichnen sich durch eine natürliche Diversität aus, da sie gegen verschiedene Epitope gerichtet sind. Zur Gewinnung der natürlichen Antikörper wird Spenderblut gesammelt und fraktioniert. Nachteilig an der Applikation dieser polyklonalen Antikörper (pAK) ist die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von Krankheitserregern, die teure Herstellung sowie die begrenzte Verfügbarkeit bei der Bekämpfung bestimmter Krankheiten (Haurum und Bregenholt, 2005).

Die zweite Generation wird von rekombinanten, monoklonalen Antikörpern (mAK) repräsentiert. Sie wirken sehr spezifisch auf ein einziges, gut charakterisiertes Antigen. mAK sind heute eines der wichtigsten biopharmazeutischen Produkte (Walsh, 2003). Zahlreiche mAK wurden für die Diagnose und Therapie von humanen Krankheiten generiert. So zum Beispiel gegen Autoimmunkrankheiten, Krebs und virale Infektionen (Chadd und Chamow, 2001), aber auch Allergien, Asthma und kardiovaskuläre Erkrankungen (Haurum und Bregenholt, 2005). Trotzdem sind mAK wahrscheinlich weniger effizient als pAK in der Neutralisierung von komplexen Antigenen, wie sie zum Beispiel von Krebszellen, Viren, Bakterien oder Parasiten präsentiert werden. Für mAK ist die Beschränkung auf ein einziges Antigen-Epitop der limitierende Faktor bei der Bekämpfung komplexer Ziele, während pAK viele Epitope eines Antigens erkennen können. Ein anderer Nachteil mAK hängt mit der Fähigkeit von vielen infektiösen Organismen oder Krebszellen zusammen, die Immunerkennung zu umgehen. Mutationen können die Bindung monospezifischer Antikörper verhindern.

pAK könnten helfen diese Einschränkungen zu umgehen. Allerdings ist die Produktion dieser Antikörper im großen Maßstab nicht unproblematisch. Konventionelle Strategien basieren auf der zufälligen Integration von Expressionsplasmiden in das Genom der Produktionszelle. Verschiedene Systeme werden dafür angewandt. Es gibt zahlreiche Arbeiten, in denen die

Verwendung eines „Zwei-Vektor-Systems“ beschrieben wird. Schwere und leichte Kette befinden sich getrennt voneinander auf zwei Plasmiden und müssen ko-transfiziert werden. Dies erleichtert zwar die Klonierung von neuen cDNAs in die Expressionskassetten, ist aber auch mit einigen Nachteilen verbunden. So kann die Integration der Plasmide an unterschiedlichen Stellen im Genom zu unausgewogenen Expressionsmengen der einzelnen Ketten oder auch zu Instabilitäten durch Rekombinationen führen (Trill et al., 1995). Dies beeinflusst die Wachstumscharakteristika einzelner Zellen und somit auch die Produktivität. „Batch-to-batch“-Variationen der Antikörperkonzentration wären die Folge. Für die Herstellung von pAK ist diese Methode nicht geeignet.

Die Alternative ist die Positionierung beider Ketten auf einem Plasmid. Häufig sind schwere und leichte Kette „in-tandem“ angeordnet und mit einem Selektionsmarker und einer Amplifikationskassette (z.B. DHFR für CHO DHFR⁻ Zellen) kombiniert (Page und Sydenham, 1991; Newman et al., 1992; Tada et al., 1994).

In einer Kooperation mit der dänischen Firma Symphogen sollte die Möglichkeiten des Kassettenaustauschsystems für die Produktion pAK erforscht werden. Durch die Integration verschiedener mAK in einen definierten Locus sowie eine definierte Kopienzahl der Antikörperexpressionskassette sollte es möglich sein, äquimolare Mengen der verschiedenen mAK herzustellen. Die mit den unterschiedlichen mAK ausgetauschten Subklone können dann für die Produktion vermischt werden. Dies sollte „batch-to-batch“-Variationen minimieren und zu reproduzierbaren Mengen der entsprechenden AK im Gemisch führen. Letztendlich können so die Produktionskosten polyklonaler Antikörper gesenkt werden.

Mit der von Symphogen entwickelten Technologie „Symplex“ werden dazu Antikörperproduzierende Zellen via Einzelzellsortierung aus menschlichem Blut isoliert. Die mRNA der schweren und leichten Kette wird in „single cell PCR“-Reaktionen revers transkribiert und in einen Expressionsvektor integriert. Beide Ketten befinden sich hierbei auf einem Plasmid. Im Rahmen der Kooperation wurden von Symphogen vier unterschiedliche Testvektoren zur Verfügung gestellt. Diese unterscheiden sich in der Orientierung der Ketten als auch in der Zusammensetzung des bidirektionalen Promotors (Abbildung 2.9) und dienen zur Festlegung von Konstruktionsparametern für künftige Austauschvektoren.

3.5.1 Die verwendeten Antikörpervektoren limitieren eine hohe spezifische Produktivität

Wenn eine Zelllinie für die industrielle Produktion rekombinanter Proteine etabliert werden soll, ist die Produktivität ein wesentliches Kriterium. Unter Verwendung der Antikörper-

konstrukte der Firma Symphogen wurden spezifische Produktivitäten von $3,5 \mu\text{g pro } 1 \cdot 10^6$ Zellen in 24h (3,5 pcd) nicht überschritten. Im Vergleich zu den Mengen die heute im industriellen Maßstab erzeugt werden, ist dies allerdings gering. Page und Sydenham (1991) generierten eine CHO-basierende Zelllinie, welche den humanisierten mAK Campath-1H im Bereich von 100 pcd exprimierten. Fouser et al. (1992) nutzten ebenfalls CHO-Zellen um einen chimären Anti-Gangliosid GD2-Antikörper zu produzieren. Auch hier wurden 80-110 pcd freigesetzt. Üblicherweise erfordern solche Mengen allerdings die Produktion in einer Zellsuspension im Bioreaktor bei hohen Zelldichten und mit genamplifizierten Zellen und sind zudem selten erreichte Werte. Generell gelten 20-60 pcd als Richtwert für eine gute Antikörperproduktionszelllinie (Andersen und Krummen, 2002). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden mit adhärennten Zellen in Kulturschalen erzielt, was von vornherein geringere spezifische Produktivitäten bedeutet.

Die Ausbeuten der mit den Expressionskassetten von Symphogen etablierten Subklone lagen unabhängig von der Zelllinie, dem Integrationsort oder dem verwendeten Konstrukt zwischen 0,3 und 3,5 pcd. Trotz der Unterschiede liegen die Werte im Vergleich zu den hohen Expressionen industriell etablierter Zelllinien nah beieinander. Die niedrige Ausbeute ist möglicherweise durch die Konstruktion der Antikörperexpressionskassetten bedingt. Eine wesentliche Voraussetzung für die gute Produktion von mAK ist die äquimolare Expression beider Ketten (Aldrich et al., 2003). So ist die Überproduktion oder Akkumulation der schweren Kette toxisch für die Produktionszelle (Köhler, 1980). Eine Analyse der Transkription und/oder Expression der einzelnen Ketten könnte Aufschluss darüber geben, ob die verwendete bidirektionale Anordnung eine homogene Expression der Ketten zulässt.

Eine Alternative zu dieser Anordnung könnte die Verwendung eines tricistronischen Konstruktes sein. Ein solches Konstrukt wurde von Douin et al. (2004) für die Ko-Expression von CD70 und CD80 in einem retroviralen Vektor verwendet. Mielke et al. (2000) benutzten einen tricistronischen Vektor für die Expression eines mAK in BHK-21 Zellen. Beide Ketten und ein Selektionsmarker wurden „in Reihe geschaltet“ und von einem CMV/MPSV-LTR-Enhancer Hybrid-Promotor sowie IRES-Elementen gesteuert. Obwohl auch hier die Produktivität zwischen 1-3 pcd lag, könnte es möglich sein durch den Austausch und die Verwendung anderer Promotoren höhere Ergebnisse zu erzielen. So wurde bereits eine Vielzahl verschiedener Promotoren für die Expression mAK verwendet. Wood et al. (1990) nutzten ebenfalls den *Adenovirus Major Late*-Promotor, Tada et al. (1994) einen MLV-LTR oder Page und Sydenham (1991) den β -Aktin Promotor.

Dennoch setzt auch der Einsatz von IRES-Elementen eine genaue Untersuchung der optimalen Anordnung (Reihenfolge) der Antikörperketten sowie der Effizienz des verwendeten IRES-Elements in den Produzentenzellen voraus. Hotta et al. (2004) benutzten

bicistronische Antikörpervektoren mit einem β -Aktinpromotor und einem EMCV-IRES und Dirks et al. (1994) einem MPSV-Promotor und einem Poliovirus-IRES-Element. Beide konnten zeigen, dass die schwere Kette im ersten Cistron (H-IRES-L) zu besseren Produktivitäten nach Transfektion führt, als die entgegengesetzte Anordnung (L-IRES-H). Harries et al. (2000) untersuchten die Verwendung verschiedener IRES-Elemente zur Produktion von IL-12. Die beiden Untereinheiten p35 und p40 des Proteins wurden als bicistronische mRNA transkribiert, gesteuert von einem MLV-LTR. Die Ergebnisse zeigten, dass die Auswahl des IRES-Elements der Expressionskassette Auswirkungen auf die IL12-Produktion in verschiedenen Zielzelllinien hatte. So zeigte sich beispielsweise, dass das EMCV-IRES effizient in NIH3T3-Zellen funktioniert und weniger gut geeignet ist für die humane Melanomzelllinie A375m, das Poliovirus-IRES hingegen in beiden Zelllinien sehr gut arbeitet. Für die Konstruktion von Antikörpervektoren bedeutet dies ebenfalls mehrere IRES-Elemente für die verschiedenen Produzentenzellen auszutesten.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Kassettenaustauschstrategie basiert auf der Markierung hochexprimierender chromosomaler Loci. Für die Produktion retroviraler Vektoren konnte gezeigt werden, dass die Expression der isolierten Integrationsorte tatsächlich hohe retrovirale Titer vermitteln kann. Dennoch wurde nach Austausch des Markierungsvektors gegen die Antikörperkassetten eine nur eine mäßige Antikörperproduktion erzielt. Die Ursache für die relativ geringe Expressionsleistung ist wahrscheinlich in der Konstruktion der Antikörpervektoren zu suchen. Die Variation von mehreren Elementen wie Promotoren/Enhancer, Spleiß-Signalen oder poly(A)-Signalen wäre demnach vorteilhaft um optimale Bedingungen für eine effiziente und äquimolare Expression beider Ketten zu erzielen. Eine andere Möglichkeit die Expressionsleistung der Zelllinien zu steigern, könnte durch eine Veränderung der Screeningmethode markierter Integrationsorte erreicht werden. Diese Möglichkeit soll in Kap. 3.7 diskutiert werden.

3.5.2 Die Vektorkonstruktion beeinflusst die Stabilität der Genexpression

Eine Verwendung der Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Marker für Selektion und zur Amplifikation nach Zugabe von Methotrexat (MTX) ist das am häufigsten verwendete System zur Generierung hochproduktiver CHO-Zellen (Andersen und Reilly, 2004). Es basiert auf einer Erhöhung der Kopienzahl des Konstruktes im Genom der Zelle als Antwort auf eine schrittweise gesteigerte MTX-Konzentration. So beeindruckend wie die Steigerungen der Produktivitäten als Konsequenz eine hohen Kopienzahl sind, umso ernüchternder sind die

Berichte über den Verlust der Genexpression in Abwesenheit des Selektionsdrucks und dem damit verbundenen Verlust der Vektorkopien (Barnes et al., 2003).

Ein Ziel der Zusammenarbeit mit Symphogen war daher neben einer gut exprimierenden Zelllinie auch die *stabile* Transgenexpression in Abwesenheit von Selektionsdrogen.

Die Stabilität der Genexpression der Subklone wurde durch die Kultivierung ohne Selektionsdruck von G418 untersucht. Mit Ausnahme des Konstrukts pAK2 führte dies zum völligen Abschalten der Antikörperexpression, bereits nach 8 Tagen Kultivierungsdauer (vgl. Kapitel 2.3.4). In nachfolgenden Southern Blot Analysen konnten Deletionen oder chromosomale „*Rearrangements*“ als Ursache dafür ausgeschaltet werden. Eine erneute Zugabe des Selektionsmittels führte nach einem vermehrten Absterben von Zellen zur Wiedererlangung der Produktivität. Die beschriebene Instabilität der Genexpression konnte in zwei verschiedenen Integrationsorten von HEK293 beobachtet werden. Daher lässt sich ableiten, dass vermutlich keine klonalen Eigenschaften der Instabilität zugrunde liegen.

In dem Vektor pAK2 mit stabiler Antikörperexpression steuert der humane EF-1 α -Promotor die Transkription der schweren Kette und den Selektionsmarker (Abbildung 2.9). Im Konstrukt pAK1 mit der gleichen Anordnung der Ketten übernimmt ein adenoviraler Promotor diese Aufgabe. Interferenzen zwischen den verschiedenen Promotoren könnten also die Ursache für den Expressionsverlust sein. Allerdings gibt es bisher dazu keine genauen Studien. Zusätzlich wirkt sich die Orientierung der Kassetten auf die Transkription aus. Im Vektor pAK4 liegen grundsätzlich die gleichen Bedingungen vor wie im Vektor pAK2. Der EF-1 α -Promotor steuert die schwere Kette, der adenovirale Promotor die leichte. Allerdings wurde die komplette Kasette in Bezug zu den FRT-Sequenzen gedreht. Der Austausch des EF-1 α -Promotors gegen den Metallothionein-Promotor verbesserte ebenfalls nicht das Expressionsverhalten. Sowohl pAK1 als auch pAK3 wiesen eine instabile Transgenexpression auf.

Grundsätzlich wäre es auch möglich, dass die Sequenz des Neomycinresistenzgens die geringe Antikörperausbeute und die variable Stabilität bewirkt. Artelt et al. (1991) schlussfolgerten, dass durch die Sequenz des Neomycinresistenzgens ein *cis*-agierender negativer Effekt auf benachbarte Promotoren ausgeht. Die Insertion des *neo*-Gens in einen retroviralen Vektor verursachte die 5 bis 10fache Abnahme der Aktivität eines benachbarten SV40-Promotors. Auch Bowtell et al. (1988) und Fernex et al. (1997) berichten von einer geringen Transgenexpression nach der Integration des *neo*-Gens in einen retroviralen Vektor. Verhoeyen et al. (2001) zeigten, dass die Entfernung des Neomycinresistenzgens aus dem 5'LTR in einer Erhöhung der Reportergenexpression in markierten Parentalklonen resultierte. Trotzdem erlaubte die Konstruktion mit dem Neomycinresistenzgen in der vorgestellten Arbeit stabile retrovirale Titer bis zu $2,5 \cdot 10^7$ i.p./ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24 h. Dies setzt

aber eine hohe Transkription der retroviralen Kasette voraus – trotz eines eventuellen negativen *cis*-Effekts.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl Orientierung der Expressionskasette als auch Zusammensetzung des bidirektionalen Promotors die Antikörperproduktion beeinflussen. Zur Klärung der genauen Ursachen für den Expressionsverlust wären jedoch systematische weitergehende Vektorvergleiche erforderlich.

3.5.3 Der Aufbau der Antikörperkasette kann zu genomischer Instabilität in Subklonen von BHK-21 und CHO-K1 führen

Bei der Auswertung der Subklone nach dem Kassettenaustausch mit den vier unterschiedlichen Vektoren zeigte sich, dass die Konstrukte pAK1/2 in den Hamsterzelllinien BHK-21 und CHO-K1 Instabilitäten oder „*Rearrangements*“ hervorriefen, jedoch pAK3/4 nicht (vgl. Abbildung 2.10 B). Interessanterweise waren humane HEK293-Zellen nicht von der Instabilität betroffen. In allen 50 analysierten Subklonen, unabhängig vom eingesetzten Vektor, konnte ein regulärer Kassettenaustausch nachgewiesen werden.

Generell fehlt den meisten technischen Studien der Genexpression in Säugerzellen, insbesondere CHO-Zellen, die Analyse der genomischen DNA, beziehungsweise der Integrität des eingesetzten Expressionssystems. Es existieren nur ungenügende Daten, welche Einzel- oder Doppelvektorsysteme vergleichen. Daher ist es nicht möglich Rückschlüsse zu ziehen oder Regeln über den generellen Aufbau von Konstrukten aufzustellen (Trill et al., 1995). So kann nur vermutet werden, dass speziestypische Eigenschaften der Hamsterzellen in Verbindung mit einem bestimmten Aufbau des Expressionsplasmids Instabilitäten forcieren. Es bleibt somit die Feststellung, dass die Orientierung der Ketten in den Austauschvektoren pAK3 und pAK4 in Hamsterzellen zwar nicht zu den beschriebenen *Rearrangements* führte, aber keine stabile Antikörperexpression zuließ.

3.6 Die Anwendung des Kassettenaustauschsystems zur Produktion von retroviralen Vektoren

Retrovirale Vektoren auf der Basis von MLV werden in der Mehrzahl der Gentherapieversuche für die Behandlung erworbener oder vererbter Krankheiten verwendet. Obwohl die Nutzung dieses Virustyps Limitationen wie vergleichsweise geringe Titer, sowie die Unfähigkeit

stationäre Zellen zu infizieren beinhaltet, verspricht die stabile Integration des Transgens einen langfristigen therapeutischen Erfolg (Merten, 2004). Die heute angewandte Methode zur Herstellung von Retroviren ist die Generierung von stabilen Zelllinien durch Transfektion des therapeutischen Vektors und anschließender Selektion. Allerdings sind gerade für die klinische Anwendung von Viren gut charakterisierte Produzentenzellen gefordert.

Die konventionelle Methode zur Etablierung geeigneter Produzenten ist durch einen aufwändigen Selektionsprozess gekennzeichnet, der für jeden neuen therapeutischen Vektor wiederholt werden muss (Yang et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit dem Kassettenaustauschsystem eine neue und flexible Produzentenzelllinie etabliert werden, welche diesen langwierigen und kostenintensiven Prozess überflüssig macht.

3.6.1 Die vorgestellte Strategie ermöglichte die Etablierung der stabilen Produzentenzelllinie Flp293A

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich HEK293-Zellen für die stabile Produktion von Retroviren eignen. Zunächst wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach geeigneten chromosomalen Loci mit einer optimalen retroviralen Markerexpression gesucht. Dieser Schritt ist kritisch für die Virusproduktion, da die Höhe der Expression des Retrovirus und somit der Titer signifikant von den Eigenschaften der chromosomalen Integrationsstelle abhängig ist. Neben dem maximalen Level der zu verpackenden RNA ist eine ausgewogene Expression der viralen Helferfunktionen gag/pol und env für einen hohen Titer nötig (Yap et al., 2000). Daher wurde in der vorgestellten Methode nicht die Höhe der einzelnen Komponenten als Grundlage für die Entwicklung der Zelllinie benutzt. Vielmehr wurde nach der Transfektion der Helferfunktionen in den retroviral markierten Parentalklon 1B2 gezielt auf die Virusproduktion, also auf ein optimales Zusammenspiel von zu verpackender mRNA und gag/pol und env gescreent. Durch diese Strategie konnte aus nur 50 Transfektanten die Zelllinie Flp293A etabliert werden, welche über einen Zeitraum von 12 Monaten einen unveränderten Titer von etwa $4 \cdot 10^6$ i.p./ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h ohne Selektionsdruck erzielte.

Davis et al. (1997) stellten nach konventioneller Methodik die HEK293-basierende stabile Verpackungszelllinie 293-SPA vor. Ein Vergleich mit der hier beschriebenen Strategie unterstreicht die Vorteile einer austauschbaren retroviralen Kasette. Davis et al. transfizierten zuerst die Helferfunktion gag/pol und analysierten die Expression von 72 Klonen. Anschließend wurde die zweite Helferfunktion env in den besten dieser Klone transfiziert. Eine weitere Selektion war nötig, um aus 42 Transfektanten den besten Virusproduzenten zu isolieren. Für die Virusproduktion ist eine Transfektion des gewünschten

retroviralen Vektors nötig. Die Titer sind in diesem Fall nicht vorhersagbar, sondern abhängig von der Anzahl der Kopien und der Integrationsstelle. Dies bedingt ein erneutes Screening.

3.6.2 Der Kassettenaustausch erlaubt eine flexible und effektive Produktion verschiedener retroviraler Vektoren

Mit der Verpackungszelllinie Flp293A konnte gezeigt werden, dass hohe retrovirale Titer auch nach dem Kassettenaustausch erzielt werden können. Der Austausch gegen den Vektor pMSIReGFP kann als konservativ bezeichnet werden, da der virale LTR und der Kassettenaufbau dem parentalen Provirus stark ähneln. Die Subklone dieses Vektors setzten etwa doppelt soviel Viren wie die Masterzelllinie frei. Dieses Ergebnis zeigt, dass die hohe Expressionskapazität des chromosomalen Locus von Flp293A auch auf die neue Austauschkassette wirkt. Im Hinblick auf den bereits erwähnten möglichen negativen *cis*-Effekt des Neomycinresistenzgens (Kap. 3.5.2), könnte ein erhöhter Titer auch dem Verlust einer Kopie des Selektionsmarkers infolge des Kassettenaustausches zugrunde liegen (vgl. Abbildung 1.5). Die Verwendung des Vektors pMLIReGFP führte sogar zu einer 6fachen Erhöhung des retroviralen Titers (Kap. 2.4.3). Dieser enthält eine von Rivière et al. (1995) entwickelte MFG-Expressionskassette, welche, verglichen mit anderen retroviralen Vektoren, eine hohe Expression des Transgens unterstützt (Kim S. H. et al., 1998).

Allerdings bedingt der Einsatz der optimierten Kassette nicht automatisch hohe retrovirale Titer. Es konnte gezeigt werden, dass die zufällige Integration von pMLIReGFP in die Verpackungszelllinie PT67 nur in einem von zwölf isolierten Klonen zu einer Produktivität von $2,4 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h führte (Abbildung 2.19 B). Der Austausch in den Locus von Flp293A hingegen resultierte in Subklonen die $2,5 \cdot 10^7$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h freisetzen. Das bedeutet, dass erst die Verbindung von hochexprimierenden Loci mit einer optimierten Expressionskassette das volle Potential eines Vektors ausnutzen kann. Außerdem zeigen diese Resultate, dass die beschriebene Strategie die Verwendung verschiedener LTRs ermöglicht.

Vanin et al. (1997) nutzten ebenfalls einen Kassettenaustausch zur Etablierung von Produzentenzellen. Allerdings wurden zwei loxP-Sequenzen zwischen die beiden LTRs kloniert. Diese Anordnung erlaubt lediglich den Austausch der Transkriptionseinheit. Für eine breite und flexible Anwendung einer Produktionszelllinie ist aber die Möglichkeit unterschiedliche Promotoren verwenden zu können erforderlich. Naviaux et al. (1996) erhielten zum Beispiel hohe Titer von HEK293-Produzenten mit modifizierten 5'LTR Vektoren, in welchen ein CMV-Promotor den gesamten U3-Bereich ersetzt. Einen solchen

Hybridpromotor enthalten ebenfalls die in dieser Arbeit verwendetet SIN-Vektoren pSINcolVII und pSINeGFP. Die etablierten Subklone zeigten mit $1,2 \cdot 10^6$ iP/ $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot 24h einen durchaus akzeptablen Titer. Dies zeigt die Flexibilität des vorgestellten Austauschsystems. Zudem erlaubt der Kassettenaustausch eine Anpassung an die aktuellen Erfordernisse therapeutischer Applikationen. In einem offenen Brief des *Gene Therapy Advisory Committee* (UK, 2005) wird die Empfehlung ausgesprochen, dass SIN-Vektoren für therapeutische Zwecke zu verwenden sind. Zudem empfiehlt das Komitee die Benutzung von nicht-viralen Promotoren für die Steuerung des therapeutischen Gens. Der Vektor pSINcolVII beinhaltet diese Empfehlungen.

3.6.3 Das Austauschsystem bietet Vorteile für die Produktion therapeutischer Vektoren

Die Anwendung des Kassettenaustauschsystems zur Produktion therapeutischer Vektoren wurde am Beispiel des humanen KollagenVII evaluiert. Hierbei ist die Methode der Komplementation des Selektionsmarkers entscheidend. Die sequenzspezifische Rekombination ermöglicht die Entfernung der proviralen DNA und nur ausgetauschte Subklone überleben die G418-Selektion. Diese Methode macht den Einsatz zusätzlicher Markergene überflüssig. Dies ist besonders wichtig, da es eine Reihe von Hinweisen gibt, dass Markergene signifikante Probleme in therapeutischen Ansätzen hervorrufen können. Ein Beispiel dafür sind mögliche Immunreaktionen auf zusätzliche Fremdgene. Dies kann in einer effizienten Entfernung der transduzierten Zellen resultieren und somit zum Ausschluss eines therapeutischen Erfolgs führen. Weitaus dramatischer sind allerdings die Folgen von Insertionsmutagenesen durch die Transduktion von Markergenen, welche im Mausmodell Leukämien hervorgerufen haben (Li et al., 2002; Baum et al., 2003). Daher ist es wichtig, dass nur das therapeutische Gen, nicht aber die für die Therapie nicht benötigten Gene, transduziert wird. Mehrere Möglichkeiten wurden dafür in Betracht gezogen. Eine Strategie ist, den Resistenzmarker in einer unabhängigen Expressionskassette auf demselben Vektor zu platzieren (Xu et al., 2004).

Loew et al. (2004) führten ein loxP-flankiertes GFP-Gen in den therapeutischen Vektor ein. Der Reporter sollte die Identifikation von hochexprimierenden Zellen ermöglichen und anschließend durch eine Cre-Rekombinase aus dem Vektor entfernt werden. Diese Strategie benötigt zwei Sortierschritte, die Positivsortierung GFP-exprimierender Zellen und dann die Selektion der rekombinierten, GFP-negativen Zellen. Ein Nachteil dabei ist die Integration des Reportergens in den therapeutischen Vektor. Durch die limitierte Größe der retroviral zu

verpackenden RNA ist das Hinzufügen zusätzlicher kodierender Sequenzen in den Vektor bei großen cDNAs nicht möglich.

Durch die Anwendung der Neomycinkomplementation des vorgestellten Kassettenaustauschverfahrens kann die Notwendigkeit von zusätzlichen Selektionsmarkern umgangen werden. Dies ermöglicht selbst die Verwendung therapeutischer Gene mit großen cDNAs. In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionskassetten mit der cDNA des humanen KollagenVII (8,8 kb) in die Masterzelllinie Flp293A integriert. Der Austausch in den hochexprimierenden Locus führte zu hohen Titern der Subklone, ohne dass weitere Screening-Schritte nötig gewesen wären. Gerade für therapeutische Transgene wie KollagenVII, deren Expression nicht direkt oder nur aufwendig nachgewiesen werden kann, ist das hier beschriebene Kassettenaustauschverfahren vorteilhaft.

3.6.4 Eine Transduktion des Neomycinresistenzgens kann durch den Vektoraufbau vermieden werden

Es ist bekannt, dass retrovirale (LTR-initierte) Transkripte Sequenzen aus dem Genom der Wirtszelle enthalten. Swain und Coffin (1992) bezifferten die Menge auf etwa 15%. Ihre Studien haben gezeigt, dass Proviren Hybridtranskripte in jedem Integrationsort produzieren können. Dies bedeutet, dass zelluläre Sequenzen zusammen mit dem retroviralen Genom verpackt werden können (Swain und Coffin, 1993). Eine der Ursachen ist ein „Durchlesen“ der viralen Sequenz über den Transkriptionsstop (poly(A)) im 3'LTR hinaus. Eine vergleichende Analyse zeigte, dass MLV-Vektoren häufig zu einer verlängerten Transkription über das Polyadenylierungssignal poly(A) hinweg neigen, dies bei HIV-Vektoren jedoch nicht beobachtet wird (Zaiss et al., 2002). Der Grund ist ein stärkeres poly(A)-Signal in diesem Virustyp.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass einige der produzierten Retroviren der ausgetauschten Subklone das Neomycinresistenzgen transduzieren (Kap. 2.4.4). In Verbindung mit dem IRES-Element bedingt die Austauschstrategie ein Durchlesen durch den 3'LTR der retroviralen Kasette, um eine IRES-vermittelte Translation des *neo*-Gens zu sichern. Nur die Transkription einer bicistronischen mRNA ermöglicht eine Resistenz der Subklone gegenüber G418. Eine Verpackung der Durchlesetranskripte ist dennoch nicht zwangsläufig, da die Größe der zu verpackenden RNA in Retroviren auf 10-11 kb begrenzt sein sollte. So konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Effizienz der Transduktion der Durchlesetranskripte zwischen den Austauschvektoren gibt. Etwa 0,01% der Viren von Subklonen nach dem Austausch mit pMLIREGFP transduzierten neo^R. Demgegenüber

verringerte sich die Anzahl um das 100fache für Viren der pMSIRcolVII-Subklone. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass in den Kollagen-Vektoren eine etwa 4fach größere zu verpackende Virussequenz (10 kb) vorliegt, welche weniger Möglichkeiten für zusätzliche Sequenzen lässt. Als Konsequenz dessen könnten in zukünftigen Austauschvektoren neutrale Sequenzen (*stuffer fragments*) zum Einsatz kommen, die keinerlei Information vermitteln aber das bicistronische Transkript so vergrößern, dass die Möglichkeit der Verpackung der Durchlesetranskripte ausgeschlossen ist. Eine Alternative dazu könnte die Verwendung stärkerer oder multipler poly(A)-Signale in den retroviralen Vektoren sein. Zaiss et al. konnten zeigen, dass das poly(A) des bovinen Wachstumshormons bis zu 8fach effizienter die Transkription beendet als das MLV poly(A). Die effizientere Termination der Transkription in diesen Vektoren erfordert allerdings, dass die Austauschvektoren mit einem Promotor statt des IRES-Elements ausgestattet werden.

Eine weitere Ursache für die Transduktion des Neomycinresistenzgens könnte ein alternatives Spleißing der mRNA der ausgetauschten Subklone sein. Die Unterschiede in der Effizienz der Transduktion des Selektionsmarkers könnten durch Sequenzunterschiede des Kollagenaustauschvektors zu erklären sein. In diesem Fall würde das Einbringen von *stuffer*-Fragmenten zu keiner Reduzierung der *neo*-Transduktion führen. Stattdessen müssten die potentiellen Spleißsignale identifiziert und eliminiert werden.

Die Transduktion des Resistenzmarkers ist zwar eine unerwünschte Nebenreaktion, zeigt aber auch einen Vorteil der Kassettenaustauschstrategie. Hiermit gelang es die Transduktion eines Durchlesetranskripts direkt nachzuweisen. Der provirale Integrationsort im Genom der Masterzelllinie lässt sich durch Sequenzierung genau ermitteln. Dies erlaubt die Klärung, ob in der unmittelbaren Nähe potentielle Onkogene zu finden sind und somit ein anderer Integrationsort für die Etablierung der Masterzelllinie verwendet werden muss. Konventionell etablierte Virusproduzenten basieren auf zufälligen (Mehrfach)Integrationen des retroviralen Vektors. Nur das Wissen um die Sequenz aller Integrationsstellen kann sicherstellen, dass sich keine Onkogene in der Nähe der Proviren befinden. Im Gegensatz dazu verfügen die nach der vorgestellten Strategie etablierten Produzentenzellen über eine Einfachkopie des retroviralen Vektors. Die Charakterisierung dieser Integrationstelle und die Wiederverwendung nach dem Kassettenaustausch machen dieses System sicherer für die Herstellung retroviraler Vektoren als die herkömmliche Transfektion.

3.7 Limitationen des Markierungssystems und mögliche Verbesserungen

In diesem Kapitel wird diskutiert, ob mit dem vorgestellten System zur Isolierung von hochexprimierenden Zelllinien tatsächlich die besten Integrationsorte gefunden werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das eGFP-Reportergen für die Selektion von hochexprimierenden chromosomalen Loci verwendet. Mehrere Gründe sprachen für dieses Gen. In den Zielzellen kann es sehr einfach nachgewiesen werden, da kein Substrat für eine enzymatische Reaktion benötigt wird. Durch den direkten Nachweis des eGFP-Proteins wird weiterhin ein indirektes Anfärben durch Antikörper vermieden. Der wesentliche Vorteil ist daher, dass eGFP-exprimierende Zellen mittels Durchflusszytometrie schnell und einfach sortiert werden können. Allerdings hat dieses Reportergen auch Limitationen in der Anwendung zur Isolierung von hochaktiven Loci. Das exprimierte Protein wird nicht sekretiert, sondern verbleibt im Zytosol der Zelle. Dies kann bei hohen Expressionen zu einer Sättigung führen, in deren Folge die Expressionsstärken einzelner Zellen nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind.

Die im Laufe der Arbeit unterschiedlich markierten Parentalklone eines Zelltyps zeigten vergleichbare eGFP-Expressionen. Dies wird bereits am FACS-Profil der infizierten Zellgemische deutlich (Abbildung 2.2). Statt einer breiten Verteilung des GFP-Signals über den gesamten Messbereich liegt die gemessene Fluoreszenzintensität der Zellen relativ nah beieinander. Dies könnte bedeuten, dass möglicherweise die Akkumulation des Reporterproteins limitierend auf die Isolierung hochexprimierender Loci wirkt, da keine Zellen oberhalb dieses gemeinsamen Peaks detektiert wurden. Eine Optimierung hinsichtlich des Reportergens würde demnach die Verwendung eines instabileren GFPs bedeuten. Solche GFP-Gene wurden bereits durch Li et al. (1998) beschrieben. Die geringere Halbwertszeit dieser Genprodukte könnte die Akkumulation im Zytosol vermeiden und so ein realistischeres Bild der Transkriptionskapazität einzelner Zellen geben.

Die Ergebnisse der Etablierung der Retrovirusproduzentenzelllinie haben gezeigt, dass die beiden Integrationsorte 1B2 und 3C2 unterschiedlich hohe Produktivitäten hervorbrachten (vgl. Kap. 2.4.1), obwohl sie im gleichen Sortierschritt isoliert wurden und eine ähnliche GFP-Expression besitzen. Dies könnte bedeuten, dass die Transduktion der Helferfunktionen gag/pol und env mit unterschiedlicher Effizienz geschah und die Überprüfung einer größeren Anzahl transfizierter Klone zu Produzenten mit vergleichbaren Titern führen kann. Allerdings korreliert der geringe Titer des Integrationsortes 3C2 gegenüber 1B2 auch mit einer

geringeren Antikörperexpression (vgl. Kap. 2.3.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkonstrukte erfordern eine effiziente bidirektionale Transkription der beiden Ketten. Die geringere Expressionsleistung des Parentalklons 3C2 könnte das Resultat einer im Vergleich zum Klon 1B2 weniger effizienten Transkription in die reverse Orientierung sein.

Speziell für die Etablierung von Antikörperproduzenten könnte der Einsatz eines sekretierten Reporterproteins von Vorteil sein, da in diesem Fall ähnliche Bedingungen in der Zelle vorherrschen wie nach dem Kassettenaustausch. Idealerweise würde man die Wirtszellen mit einer Antikörperexpressionskassette markieren und so gezielt nach Loci suchen, welche eine optimale Expression von Antikörpern ermöglichen. Nach erfolgter Isolierung könnten andere Antikörperkassetten in den markierten Locus eingebracht werden. Die Sortierung der markierten Zellen kann ebenfalls mit der Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Die Sekretion von Proteinen beinhaltet das Verschmelzen von Sekretvesikeln mit der Zellmembran. In diesem Stadium können die zu sezernierenden Proteine mit Antikörpern an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Brezinsky et al., 2003). Die Proteinmenge an der Oberfläche korreliert mit der Menge des sekretierten Proteins und ermöglicht die Selektion geeigneter Produzentenzellen.

Eine weitere Limitation des vorgestellten Taggingssystems stellt der verwendete Selektionsmarker Neomycinphosphotransferase dar. Wie bereits beschrieben (vgl. Kap. 2.2.3) wurde die Anzahl an Sortierschritten auf 2 begrenzt. Die ursprüngliche Idee einen außergewöhnlich guten Produzenten zu erhalten war aber eine Mehrfachsortierung, dass heißt zunächst 3 bis 4mal die Population hinsichtlich einer hohen GFP-Expression anzureichern und abschließend eine Einzelzellsortierung durchzuführen. Unerwarteterweise waren etwa 75 % dieser Klone resistent gegenüber G418 und somit nicht für den Kassettenaustausch einsetzbar. Die Ursache hierfür liegt vermutlich an der erhöhten Basisexpression des *Δneo*-Gens bei den hochexprimierenden Klonen. Häufig befinden sich hochexprimierende Integrationsorte in transkribierten Bereichen des Genoms. Die Integration des Provirus kann demnach das Neomycinresistenzgen im 5' LTR in direkte Nähe zu einem zellulären Promotor bringen („Promotor-Trapping“). Durch eine hohe Transkriptionsaktivität ist dann die Bildung einer funktionalen mRNA möglich. Die Resistenz gegenüber G418 ist weiterhin dadurch charakterisiert, dass nur geringe Mengen der Neomycinphosphotransferase in der Zelle vorhanden sein müssen, also eine geringe Häufigkeit der Transkription genügt. Eine Behebung dieses Problems könnte durch die Verwendung eines anderen unvollständigen Selektionsmarkers erzielt werden, beispielsweise Puromycin oder Histidinol. In diesen Fällen wird eine größere Menge Protein für eine

Resistenz benötigt und somit die Wahrscheinlichkeit resistente Zellen zu generieren minimiert.

Eine umfangreiche Analyse der Eignung von CHO-K1-Zellen für das Kassettenaustauschverfahren wurde durch die geringe genetische Diversität der isolierten Integrationsorte limitiert. Eine Ursache hierfür war die schlechte Infektionseffizienz dieser Zelllinie. Die Anwesenheit von zellulären Rezeptoren bestimmt den Eintritt des Retrovirus in die Wirtszelle. Sind diese nicht vorhanden, ist eine Infektion nicht möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die CHO-K1-Zellen in dieser Arbeit nur über den Pit-1 Rezeptor zu infizieren waren, BHK-21-Zellen jedoch über den mCat-Rezeptor (vgl. 2.2.1). Durch die Transduktion der Zellen mit einem entsprechenden Rezeptor (Albritton et al., 1989), zum Beispiel mCat, könnte eine Infektion ermöglicht und die retrovirale Markierung effizienter werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene System zum Markieren von chromosomalen Loci basiert auf einem retroviralen Vektor. Der Einsatz von Retroviren bietet für diesen Zweck Vorteile. Diese wurden bereits im Kapitel 1.2.2 beschrieben. Dennoch sind diese Vorteile mit einigen Einschränkungen verbunden. Die Suche nach hochaktiven Integrationsorten würde eine breite und zufällige Streuung von markierten Loci im zellulären Genom voraussetzen. Retroviren integrieren aber nicht zufällig, sondern haben bestimmte Präferenzen (Wu et al., 2003). Diese bevorzugten Stellen befinden sich sehr häufig innerhalb transkribierter Bereiche oder 5 kb „*upstream*“ bzw. „*downstream*“ des Transkriptionsstartpunktes. Eine solche Präferenz bedeutet zum einen, dass meist in transkriptionell offene Bereiche integriert wird. Zum anderen aber werden durch die Bevorzugung bestimmter Sequenzen durch den retroviralen Vektor viele mögliche, oder sogar bessere chromosomale Loci ausgeschlossen. Demnach könnte durch Transfektion oder Elektroporation versucht werden, eine breitere Streuung an Integrationsorten zu erhalten. Dies würde allerdings zur Folge haben, dass der Vorteil der retroviralen Infektion, nämlich unter geeigneten Bedingungen Einzelkopien zu erhalten, entfällt. Eine größere Anzahl isolierter Klone müsste dann auf Kopienzahl des Markierungsvektors überprüft werden.

Für die Produktion retroviraler Vektoren konnte gezeigt werden, dass der Kassettenaustausch reproduzierbar zu hohen Titern führt, die sogar die Produktivitäten konventionell etablierter Zelllinien übertreffen. Das Markieren chromosomaler Loci mit dem beschriebenen Markierungssystem ist für diese Anwendung also erfolgreich und geeignet. Auch mit Veränderungen des Reportergens und des Selektionsmarkers werden nur schwer noch bessere Integrationsorte wie der der Masterzelllinie Flp293A zu finden sein. Die für die

Antikörperproduktion erzielten Expressionen sind allerdings unbefriedigend. Daher ist zu erwarten, dass die Expression rekombinanter Proteine in anderen und anders isolierten chromosomalen Loci höher ist und die Anforderungen an eine Proteinsekretion besser erfüllen. Für diesen Teil der Arbeit kann demnach geschlussfolgert werden, dass die vorgestellte Sortierungsstrategie verändert und optimiert werden muss.

3.8 Ausblick

3.8.1 Anwendung der vorgestellten Strategie für eine flexible und hohe Proteinexpression

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es möglich ist, mit Hilfe der Kassettenaustauschstrategie eine vorhersagbare Proteinexpression zu erzielen. Die diskutierten Modifikationen zur Verbesserung der Markierungsstrategie sowie gezielte Veränderungen der Expressionsvektoren könnten zu einer höheren Proteinausbeute führen und so die Attraktivität der Strategie für die biotechnologische Produktion steigern. Gerade für eine Anwendung des Kassettenaustauschs in CHO-Zellen ist die Verknüpfung mit etablierten Methoden zur Expressionssteigerung denkbar. Die Selektion des DHFR-Gens in DHFR-defizienten Stämmen (z.B. CHO-DG44) ist die am häufigsten angewandte Prozedur. Dabei wird die Methotrexatkonzentration im Kulturmedium transfizierter Zellen schrittweise erhöht. Nur die Zellen mit einer hohen DHFR-Expression überleben, häufig aufgrund einer Amplifikation des transfizierten DHFR-Gens. Letztlich enthält das Genom der Zelle mehrere hundert Kopien der Expressionskassette. Transfiziert man ein Expressionsplasmid mit dem DHFR-Gen und der cDNA des zu produzierenden Gens, dann kann die spezifische Produktivität durch Amplifikation drastisch erhöht werden. Auch für die Kassettenaustauschstrategie ist der Einsatz des DHFR-Gens möglich. Dieses kann direkt in die Austauschkassette integriert werden. Allerdings entfällt dann ein wichtiger Vorteil dieser Strategie, nämlich eine schnelle Etablierung von Produzentenzellen, da die Selektion mit Methotrexat viele Subklonierungen und demnach ein extensives Screening bedeutet. Letztendlich wird die Verbindung von Kassettenaustausch und Genamplifikation für Produktionen mit dem Ziel von sehr hohen Ausbeuten interessant sein.

Im Gegensatz dazu bietet die Austauschstrategie für die bereits beschriebene Produktion von polyklonalen Antikörpern eine weitere Zeit- und Kostenersparnis. Hier kommt es neben guten Expressionsleistungen vor allem auf eine homogene Produktion und somit Zusammensetzung

des „Antikörpercocktails“ an. Statt mehrerer Austausche einzelner Antikörper-cDNAs in die Masterzelllinie und dem anschließenden Mischen der Subklone, könnte versucht werden, einen simultanen Kassettenaustausch durchzuführen. Zu diesem Zweck müssten mehrere Antikörperexpressionskassetten gleichzeitig in die Masterzelllinie transfiziert werden. Da alle verwendeten Expressionskassetten für Antikörper kodieren ist nicht davon auszugehen, dass sich die Proteinexpression oder die Wachstumsrate der Subklone signifikant unterscheiden. Das Resultat wäre eine heterogene Produktionskultur mit homogenen Produktionseigenschaften.

Die Kassettenaustauschstrategie kann weiterhin von jedem benutzt werden, der in relativ kurzer Zeit hohe und vorhersagbare Produktionen von Proteinen im Labormaßstab benötigt. Ein Beispiel hierfür wäre die Strukturbiologie. Verschiedene Austauschvektoren können etabliert werden, in denen geeignete Restriktionsstellen eine einfache Klonierung der cDNA vor unterschiedliche Promotoren gestatten. Der Kassettenaustausch und hochexprimierende Loci ermöglichen die Produktion des zu untersuchenden Proteins innerhalb weniger Wochen.

3.8.2 Erweiterung der Masterzelllinie durch ein austauschbares env-Protein

Das Spektrum an Zellen die mittels Retroviren transduziert werden können (Tropismus), wird durch die Art des env-Proteins der viralen Partikel bestimmt. Die hier entwickelte Masterzelllinie wurde mit einem amphotropen env-Gen ausgestattet. Dies begrenzt allerdings einen universellen Einsatz der produzierten Viren für therapeutische Zwecke. Zum Beispiel transduzieren Viren die mit dem *gibbon ape leukemia virus* (GALV)-env oder dem *feline endogenous retrovirus* RD114-env pseudotypisiert sind, hämatopoetische Stammzellen (HSC) effektiver als amphotrope Viren (van Hennik et al., 1998; van der Loo et al., 2002). Ebenfalls möglich wäre die Pseudotypisierung mit dem G-Protein des *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) (Barquinero et al., 2004). VSV-G interagiert mit den Membranphospholipiden und benötigt keine Rezeptoren für den Zelleintritt. Dies erlaubt ein sehr breites Spektrum von Infektionen (Yee et al., 1994). Weiterhin stabilisiert VSV-G die viralen Partikel und ermöglicht die Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation (Burns et al., 1993; Chen et al., 1996; Ory et al., 1996; Yee et al., 1994). Nachteilig am Einsatz von VSV-G ist aber die Toxizität des Proteins und dem damit verbundenen Absterben der Produzentenzellen. Diesem Nachteil kann man mit induzierbaren/regulierbaren Promotoren begegnen (Ory et al., 1996; Yang et al., 1995). Um sich die Möglichkeiten verschiedener env-Proteine nützlich zu machen, kann die Masterzelllinie um eine zusätzliche austauschbare Kasette erweitert werden. Eine solche

erweiterte Zelllinie ist schematisch in der Abbildung 3.1 dargestellt. Der chromosomale Locus 1 repräsentiert den retroviralen Markervektor, welcher gegen eine therapeutische Kassette ausgetauscht werden kann. Der zweite Locus stellt die gag/pol-Expressionskassette dar.

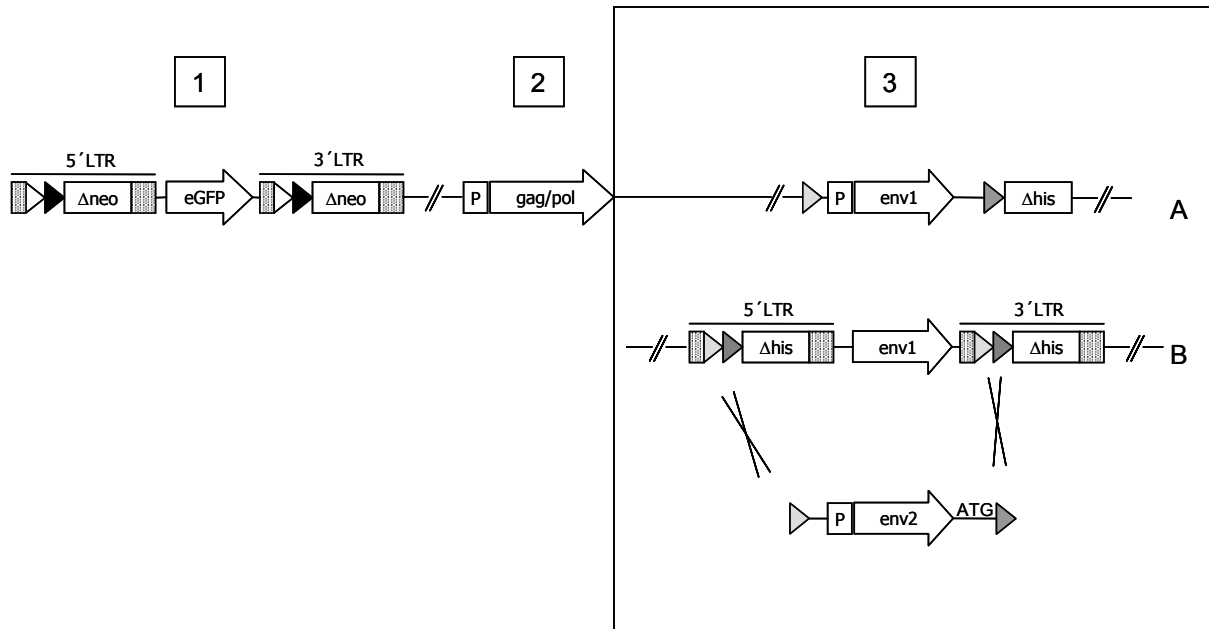


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer erweiterten Masterzelllinie. Locus 1: Austauschbarer retroviraler Vektor. Locus 2: gag/pol-Expressionskassette. Locus 3: Austauschbare env-Kassette, entweder integriert in ein Expressionsplasmid (A) oder einen retroviralen Vektor (B). Der Austausch kann über FRT-Mutanten oder das Cre/loxP-Rekombinationssystem gesteuert werden. Als Selektionsmarker könnte ein deletiertes Histidinolresistenzgen verwendet werden, welches durch den Kassettenaustausch komplettiert wird.

Die austauschbare env-Kassette des Locus 3 könnte entweder via Infektion (B), analog zum retroviralen Markervektor, oder mittels Transfektion/Elektroporation transduziert werden (A). Für einen erfolgreichen Kassettenaustausch wäre allerdings eine Einzelkopie der env-Kassette notwendig. Der Austausch kann über zusätzliche heterologe FRT-Sequenzen, die nicht mit den FRTs des ersten Locus rekombinieren, realisiert werden. Schlake und Bode (1994) beschrieben mehrere Mutanten der FRT-Sequenzen, die diese Bedingung erfüllen. Alternativ könnte aber auch das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet werden.

Ein wichtiges Element für den Austausch einer env-Expressionskassette ist die Verwendung eines zweiten Selektionsmarkers neben dem des für den Austausch des retroviralen Vektors nötigen *neo*-Gens. Hierfür könnte zum Beispiel ein deletiertes Histidinolresistenzgen eingefügt werden (Abbildung 3.1).

Eine auf diese Weise ausgestattete Masterzelllinie kann auf die unterschiedlichsten Anforderungen eines Gentherapieversuchs angepasst werden und erlaubt ein Höchstmaß an Flexibilität.

3.8.3 Etablierung einer Helferzelllinie zur stabilen Produktion von HIV1-lentiviralen Vektoren

Für bestimmte Aufgaben in der klinischen Anwendung kann es nachteilig sein, dass MLV-basierende Vektoren keine stationären Zellen infizieren können. Nach dem Eindringen des Virus in das Zytoplasma der Wirtszelle und der reversen Transkription erfordert der Transport des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern ein mitotisches Auflösen der Kernmembran (Miller et al., 1990; Roe et al., 1993).

Die Integration von lentiviralen Vektoren hingegen ist mitoseunabhängig und erlaubt die Infektion von nicht proliferierenden Zellen (Bukrinsky et al., 1992; Lewis et al., 1992; Weinberg et al., 1991). So konnten mit Lentiviren ruhende Zellen wie Retinazellen, Zellen des zentralen Nervensystems oder hämatopoetische Zellen *in vitro* und *in vivo* transduziert werden (Vigna und Naldini, 2000).

Die Herstellung von lentiviralen Vektoren wie das HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) Typ1 verläuft über eine transiente Transfektion oder mittels Verpackungszelllinien, in welchen die Expression von HIV-1 gag/pol Proteinen induziert möglich ist (Sparacio et al., 2001; Klages et al., 2000). Die stabile Expression von HIV-gag/pol würde eine kontinuierliche und reproduzierbare Vektorproduktion ermöglichen, scheiterte aber bisher an der Toxizität der HIV-1 Protease (Kaplan und Swanstrom, 1991).

Ikeada et al. (2003) gelang es dennoch eine stabile Verpackungszelllinie mit einem kodon-optimierten HIV1-gag/pol und MLV-basierendem env zu etablieren. Dazu klonierten sie die kodierenden Sequenzen von HIV1-gag/pol in einen retroviralen Vektor und infizierten die Zielzellen. Die Titer dieser Zelllinie erreichten 10^7 iP/ml und waren für mindestens 3 Monate stabil. Strang et al. (2004) benutzten verschiedene retrovirale env-Proteine (MLV-A, GALV, RD114) um diese Zelllinie zu pseudotypisieren und HIV-1-Vektoren herzustellen.

Basierend auf der von Ikeda entwickelten Zelllinie könnte ebenfalls eine flexible lentivirale Produktionszelllinie entwickelt werden, bei der es möglich ist, sowohl den therapeutischen Vektor, als auch das env-Protein auszutauschen. Zusammen mit der retroviralen Masterzelllinie FLP293A könnte so ein umfangreiches Spektrum verschiedener Vektoren für vielfältige Anwendungen genutzt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Tischzentrifugen	Eppendorf 5417C Heraeus Biofuge 13 Heraeus Christ Minifuge GL Hettich Rontana/S
Kühlzentrifugen	Sorval Superspeed RC5 Minifuge Heraeus-Christ Biofuge fresco Festwinkelrotoren: GSA, GS3, SS34 Schwingbecherrotor: HB4
Photometer	Hitachi U-1100
Fluorometer	Hoefer Dyna Quant 200
Fluoreszenz-Elisa-Reader	Wallace Victor ² 1420 Multilabel counter Labsystems Multiskan
Gelelektrophoresekammer	BRL Horizon 58 BRL Horizon 1114 BRL Horizon 2025 Owl Separation System, Model: A2
Mikroskop	Leitz Labovert FS Leica DMIL
UV-Kammer	Hanau
Phosphoimager	Molecular Dynamics Storm 860
Videograph	Biotec Fischer Video Densitometer Mitsubishi Thermodrucker und Personal Computer
Netzgeräte	Desaga Mains Power Supply Unit 1200/200 Biorad Power Pac 300
Durchflusszytometer & Software	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson FACS <i>Vantage</i> SE von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Luminometer	Berthold Lumat LB 9501
Zellzähler	Schärfe System Casy 1 DT
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336
Sterilbänke	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400

	Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18
pH-Meter	M 340, Beckmann
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Elektroporator	Biorad Gene Pulser und Pulse Controller
Hybridisierungssofen	Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310 Stuart Scientific Hybridization Incubator
Laborschüttler	Heidolph
Wasseraufbereitung	Millipore Milli-Q

4.2 Material

Es wurden Chemikalien der Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitex, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB. Die Enzyme lieferten Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma und USB. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word, Powerpoint und Excel der Firma Microsoft erstellt. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0 der Firma Adobe. Zur Auswertung von Autoradiographien wurde das Programm Image Quant Version 5.0 von Molecular Dynamics benutzt. Zur Entwicklung von Klonierungsschritten, zum Auffinden von PCR-Primer-Sequenzen und zur Restriktionskartierung wurde das Programm Vector NTI 5.0 der Firma Invitrogen verwendet.

4.3 Allgemeine Grundtechniken

4.3.1 Sterilisation durch Hitze

Glasgeräte werden 4 h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Jegliche Materialien aus Plastik wie Eppendorffgefäße und Pipettenspitzen, Lösungen und Holzstäbe werden 25 min bei 121°C autoklaviert.

4.3.2 Sterilisation durch Filtration

Lösungen, die nicht autoklaviert werden können, werden mit Filtern mit einer Porengröße von 2 µm (Sartorius) sterilisiert.

4.3.3 Phenolisieren von DNA

Phenol (Fa. Roth): Re-distilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol (pH 7.8 bis 8.0), 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin

TE-Puffer: 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl in H₂O, pH 8.0

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-haltigen Lösung wird diese mit einer Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1) im gleichen Verhältnis versetzt und auf dem Vortexer vermischt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (1 min; 13000 rpm). Die wässrige Phase wird abgenommen und erneut mit der Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt, um Phenolreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird die wässrige Phase abgenommen und kann weiterverarbeitet werden.

4.3.4 Fällung von DNA

LiCl/Ethanol: 0,6 M LiCl in Ethanol (Lagerung bei -20°C)

Die DNA-haltige Lösung wird mit dem 2fachen Volumen LiCl/Ethanol-Lösung versetzt und für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min; 13000 rpm; 4°C) wird die DNA mit 70%igem Ethanol entsalzt. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

4.4 Modifizierung von DNA

4.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA wird mittels Restriktionsenzymen gespalten, wobei die vom Hersteller der Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) verwendet werden. Die Reaktion kann durch Erhitzen (20 min bei 65°C/80°C) oder Phenolisierung abgestoppt werden.

4.4.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer: 50 mM Tris/HCl in H₂O, pH 7,2, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM DTT

dNTP-Mix: je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden maximal 1 µg DNA mit 5'-überstehenden Enden mit 3 µl des dNTP-Mixes und 1 U Klenow-Enzym (Gesamtvolumen 50 µl) bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen (80°C; 20 min) gestoppt.

4.4.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

10x Phosphatase-Puffer: 500 mM Tris/HCl, pH9,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin

Zur Verhinderung der Religation eines gespaltenen Vektors werden die 5- oder 3'-überstehenden Enden mit alkalischer Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“ (SAP)) dephosphoryliert. Dazu werden 20-100 pmol überstehende Enden mit 10x Phosphatase-Puffer und 1-2 U SAP (Gesamtvolumen 50 µl) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen (80°C; 20 min) abgebrochen.

4.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

5x Ligase-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH7,6, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT

In einem 10 µl Ansatz mit 2 µl 5x Ligase-Puffer 1 U T4-DNA-Ligase werden ca. 20 fmol des Vektorrückgrats und ca. 60 fmol des zu inserierenden DNA-Fragmentes bei RT für mindestens 4 Stunden inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Der Ansatz kann nun für die Elektrottransformation verwendet werden.

4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Azetat, pH7,5, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

5x Probenpuffer: 15% Ficoll, 50 mM EDTA, 1x TAE, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol

Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in kochendem 100 ml TAE-Puffer gelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nachdem Erstarren der Agarose wird diese in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Die Proben werden mit dem 5x Probenpuffer vermischt und auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wird neben dem Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 V und 30 mA. Anschließend können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) betrachtet werden. Zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten werden diese aus dem Gel geschnitten und unter Zuhilfenahme des „QIAquick“-Kits isoliert.

4.4.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Quiagen)

Die zu isolierende DNA wird aus dem Agarose-Gel geschnitten. Das Gelstück wird unter Hochsalzbedingungen bei 50°C für 10 min geschmolzen. Die Lösung wird auf eine Silica-Membran gegeben und bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säulenmatrix, während die Agarose-Salz-Lösung sedimentiert. Nach Waschen der Säule mit einem Ethanol-haltigen Puffer kann die DNA mittels TE-Puffer oder H₂O durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min eluiert werden.

4.5 Southern Blot Analyse

4.5.1 Random priming mit „Rediprime DNA Labelling System“ (Amersham Life Science)

Labelling-Mix: dATP, dGTP, dTTP, exonukleasefreies Klenow-Enzym,
Oligonukleotidprimer (9mer)

Es werden 2,5-100 ng DNA (z.B. Sonde für Southern Blot Analyse) in einem Gesamtvolumen von 45 µl sterilem H₂O aufgenommen und bei 95°C im Wasserbad für 5 min erhitzt. Die Lösung wird in ein Eisbad abgekühlt und anschließend zum Labelling-Mix gegeben. Nach Zugabe von 5 µl α-³²P-dCTP wird der Ansatz bei 37°C für 10-30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Die markierte DNA wird über Micro-Spin™ G50-Säulen (Pharmacia Biotech) von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt. Dazu wird der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und bei 2800 rpm für 2 min zentrifugiert. Für den Einsatz in Southern Blot Analysen wird die DNA durch Erhitzen bei 95°C im Wasserbad für 5 min und anschließender Abkühlung im Eisbad denaturiert.

*Hergestellte
Sonden*

Neomycin-resistenzgen	570 bp Fragment (<i>PvuII/BamHI</i>) aus pSBC2Neo
β-Galaktosidase	1000 bp Fragment (<i>EcoRI/SacI</i>) aus pSBC2Gal
CMV-Promotor	518 bp Fragment (<i>BamHI/SacI</i>) aus pTARDKL
IRES-Element	350 bp Fragment (<i>NcoI/HindIII</i>) aus pAK2

4.5.2 Herstellung eines Markers aus λ-DNA

10x dNTP-Mix jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Zur Größenbestimmung von Fragmenten im Southern Blot wird eine mit ³⁵S-dATP markierte, *HindIII/EcoRI*-verdaute λ-DNA eingesetzt. Dieser Größenmarker wird durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym hergestellt. Dazu werden ca. 1 µg λ-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl 10x dNTP-Mix, 4 µl α-³⁵S-dATP (>1000 Ci/mmol) und 2 U Klenow-Enzym versetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 1 h wird die Reaktion mit 20 µl Stopp-Lösung (0,5 M EDTA) abgebrochen und die DNA über eine Sephadex G50-Säule aufgereinigt.

4.5.3 Isolierung von hochmolekularer DNA (HMW-DNA) aus Säugerzellen

„Modified Bradleys“-Lösung: 10 mM Tris/HCl, pH/.5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS,
1 mg/ml Proteinase K

Natriumacetat-Lösung: 75 mM Natriumacetat in Ethanol

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und in 0,5 ml „Modified Bradleys“-Lösung aufgenommen. Die Lösung wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Anschließend wird die DNA der Zellen durch Inkubation mit 1 ml Natriumacetat-Lösung für 2-3 h bei RT gefällt und durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min pelletiert. Die DNA wird durch Zugabe von 0,5 ml 70%igem Ethanol für 30 min gewaschen und anschließend erneut bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Waschschrift wird wiederholt, bevor die DNA nach Trocknen bei RT für 10 min in 30 µl TE-Puffer aufgenommen werden kann. Die isolierte HMW-DNA kann direkt in Southern-Blot Analysen oder für andere Untersuchungen (z.B. RT-PCR) eingesetzt werden.

4.5.4 Restriktionsverdau der HMW-DNA

Es werden 8-10 µg der aufgereinigten HMW-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl 10x Restriktionspuffer, 0,5 µl RNase (10 µg/ml), 0,5 µl BSA (100x) und 20-40 U Restriktionsenzym versetzt. Anschließend erfolgt die Inkubation des Reaktionsansatzes bei entsprechender, vom Restriktionsenzym abhängiger Reaktionstemperatur über Nacht. Die verdaute DNA wird mit 8 µl 6x Probenpuffer versetzt und auf einem 0,8%igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wird eine ³⁵S-markierte, mit *HindIII/EcoRI*-verdaute λ-DNA eingesetzt.

4.5.5 DNA-Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wird auf eine positiv geladenen Nylonmembran (Hybond-XL oder -N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Dazu wird das Agarose-Gel zuerst in 0,4 M NaOH-Lösung neutralisiert. Für den Transfer langer DNA-Fragmente (>5 kb) empfiehlt sich eine vorherige Depurinierung mittels 0,25 M HCl für ca. 30 min, da die DNA-Fragmente während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen und somit aus dem Gel austreten können. Das Gel wird mit der Oberseite auf feuchte Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen Ränder in 0,4 M NaOH eintauchen, gelegt. Die Unterseite des Gels wird mit der Nylonmembran bedeckt. Auf diese werden zwei Lagen weiteres, feuchtes Filterpapier, eine Lage trockenes Filterpapier und ein Stapel mit saugfähigem Papier gelegt. Die Apparatur wird mit ca. 500 g Gewicht beschwert.

Nach ca. 6 h ist der DNA-Transfer vom Gel auf die Nylonmembran abgeschlossen. Die Nylonmembran wird in 2x SSC neutralisiert und bei 80°C für 2 h inkubiert.

4.5.6 Hybridisierung der transferierten DNA

Hybridisierungslösung: 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH7,5, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 250 µg/ml Heringssperma-DNA (sonifiziert) (Lagerung bei -20°C)

Waschlösung A: 2x SSC, 0,5% SDS

Waschlösung B: 1x SSC, 0,1% SDS

Es werden 20 ml der Hybridisierungslösung bei 65°C im Wasserbad aufgetaut, bei 95°C im Wasserbad für 10 min erhitzt und wieder auf 65°C abgekühlt. Die Lösung wird in eine Glasröhre für den Hybridisierungssofen überführt. Außerdem wird die Nylonmembran mit der DNA-freien Seite an die Innenwand der Glasröhre gelegt. Dann wird eine denaturierte,

radioaktiv markierte Sonde in die Glasröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen.

Anschließend wird die Nylonmembran bei RT für 5 min, bei 65°C für 30 min und bei 65°C für 5 min mit Waschlösung A gewaschen. Bei hoher Strahlung der Membran empfiehlt sich ein Waschschriff bei 65°C für 30 min mit Waschlösung B. Die Membran wird dann feucht in Folie verpackt und in eine Expositionskassette (Phosphoimager) gelegt.

4.5.7 Re-Hybridisierung

Die Nylonmembran wird mit kochendem 0,5%igem SDS für ca. 30 min gewaschen. Dabei wird die an DNA-Fragmenten auf der Membran gebundene radioaktiv markierte Sonde abgelöst. Die Vollständigkeit dieses Prozesses wird durch Exposition sichergestellt. Anschließend kann die Nylonmembran für eine weitere Hybridisierung verwendet werden.

4.6 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.6.1 Verwendete Stämme

XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacI^qZ]M15, Tn10, (tet^r), (Bullock, 1987)

DH10B: F', mcrA⁻-(mrr hsdRMS-mcrBC), Φ 80d/lacZ]M15,)/lacX74, deoR, recA1, ara139,)(ara-leu)7697, galJ, galK, λ^- , rpsL, end A1, nupG (Gibco BRL)

4.6.2 Medien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

Ampicillin: 50 mg/ml Ampicillin in Ethanol, sterilfiltriert

Kanamycin: 100 mg/ml Kanamycin in H₂O, sterilfiltriert

SOG-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose (MgSO₄ und Glucose werden vor Gebrauch zugesetzt)

4.6.3 Herstellung von Agarplatten

Es werden 15 g Agar (Difco) zu 1 l LB-Medium gegeben und aufgekocht. Nach Abkühlen der Agar-Lösung werden für Ampicillin-haltige Agarplatten 1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml) und für Kanamycin-haltige Platten 0,5 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) zur Agar-Lösung gegeben und diese auf Bakterienplatten verteilt.

4.6.4 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Die Bakterien werden in 5 bis 10 ml LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur zu 1 l LB-Medium gegeben und abermals unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung wird beendet, wenn die Bakteriensuspension einen OD-Wert (optische Dichte) von 0,6 bis 0,8 (exponentielle Wachstumsphase) bei 600 nm erreicht hat. Anschließend wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm (GS3-Rotor) und 4°C pelletiert. Nach Resuspension in kaltem, sterilem Wasser und wiederholter Zentrifugation werden die Bakterien in 20 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen und 15 min bei 3500 rpm (SS34-Rotor) und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien werden anschließend in 2 bis 3 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, in Aliquots zu 50 µl in Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Anschließend kann die Kompetenz der Bakterien mit der Transformation eines Standardplasmids bestimmt werden.

4.6.5 Elektrotransformation kompetenter Bakterien

Es werden 50 µl kompetente Bakterien aufgetaut, auf Eis gestellt und mit ca. 1 µl verdünnter DNA-Lösung oder Ligationsansatz versetzt, vermischt und in eine vorgekühlte Transformationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand gegeben. Diese wird in der Gene-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld (2,5 kV, 25 µF, 200Ω) ausgesetzt. Die Impulsdauer sollte bei 4 bis 5 ms liegen. Sofort nach Transformation werden die Bakterien in 1 ml SOG-Medium aufgenommen und 30 min unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden Aliquots der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bis zur Klonbildung kultiviert.

4.6.6 Konservierung von Bakterien

Zur kurzfristigen Lagerung werden Bakterien mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht wird diese bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung werden Bakterien über Nacht in LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wird im Verhältnis 1:1 mit 87%iger Glycerin-Lösung vermischt und in Glasgefäßen bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

4.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab

STET-Puffer: 80 g/l Sucrose, 0,5% Triton X100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) in H₂O

TE-Puffer: 0,1 mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H₂O, pH 8.0

Lysozym: 10 mg/ml Lysozym in TE-Puffer

Ammoniumacetat: 8 M NH₄Oac in H₂O

TE-RNase: 10 µg/ml RNase A in TE-Puffer

Es werden 1,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit den zu untersuchenden Bakterien angeimpft und diese für 12 bis 16 Stunden unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakterien werden in Eppendorfgefäßen 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, mit 500 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 50 µl Lysozym-Lösung versetzt. Nach 2 bis 3 minütiger Inkubation bei RT werden die Bakterien 90 s in einem Thermoblock bei 95°C erhitzt und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das zähflüssige Pellet wird mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Die klare Lösung wird mit 50 µl Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl Isopropanol vermischt und erneut 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird nach kurzem Trocken bei RT in 50 bis 100 µl TE-RNase-Lösung aufgenommen.

4.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Qiagen)

<i>Resuspensionspuffer:</i>	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
<i>Lysepuffer:</i>	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
<i>Neutralisierungspuffer:</i>	3,0 M Kaliumacetat, pH5,5
<i>Äquilibrierungspuffer:</i>	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol, 0,15% TritonX100
<i>Waschpuffer:</i>	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol
<i>Elutionspuffer:</i>	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15% (v/v) Isopropanol

Es werden 200 ml (Midi-Präparation) bzw. 500 ml (Maxi-Präparation) Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien 10 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und in 4 ml bzw. 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wird vorsichtig bei RT mit 4 ml bzw. 10 ml Lysepuffer versetzt. Die Lysierung der Bakterien wird nach 5 min durch Zugabe von 4 ml bzw. 10 ml Neutralisierungspuffer abgebrochen. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis, werden die bakteriellen Bestandteile durch 30 minütige Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C abgetrennt. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wird über Filter auf eine mit 4 ml bzw. 10 ml Äquilibrierungspuffer vorbehandelte Anionenaustauschsäule gegeben, die Plasmid-DNA bei bestimmter Salzkonzentration und pH-Wert binden kann. Zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen wird die Säule zweimal mit 10 ml bzw. 30 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml bzw. 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 3,5 ml bzw. 10,5 ml Isopropanol gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C wird die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung wird die Plasmid-DNA in TE oder H₂O aufgenommen.

4.7 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.7.1 Verwendete Zelllinien

<i>NIH3T3</i>	embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie (ATCC CRL-1658)
<i>BHK-21</i>	Isoliert aus Nierenzellen eines neugeborenen Syrischen Hamsters; verwendet wurde hier der Klon BHK-21-A

(Karreman C. et al., 1996)

HEK-293

Etabliert aus humanen embryonalen Nierenzellen nach Transformation mit Adenovirus Typ 5 (DSMZ ACC 305)

CHO-K1

Subklon einer Parentalzelllinie aus Eierstock-Biopsie eines adulten chinesischen Hamsters (DSMZ ACC 110)

*Retrovirale
Verpackungszelllinie*

Env/Tropismus

Ursprung

PA317

amphotrop

NIH3T3 basierende retrovirale Verpackungszelllinie (ATCC CRL-9078)

PG13

GALV

NIH3T3 basierende retrovirale Verpackungszelllinie (ATCC CRL-10696)

ψ2

ecotrop

NIH3T3 basierende retrovirale Verpackungszelllinie (DSMZ ACC328)

PT67

amphotrop

NIH3T3 basierende retrovirale Verpackungszelllinie (Clontech GmbH, Cat. No. K1060-D)

4.7.2 Grundmedien

DMEM-Grundmedium
(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)

13,63 g/l DMEM-Pulver; 3,67 g/l (44mM) NaHCO₃;
2,6 g/l (10mM) HEPES; pH 7,2

Ham 's F12-Grundmedium

Nut. Mix F12 (HAM) mit Glutamax-1 (L-Alanyl-L-Glutamin),
Fa. Gibco

PBS

(Phosphate buffered saline)

8 g/l (140mM) NaCl; 0,2

TEP

6 mM EDTA, 0,1-0,2% Trypsin (Gibco) in PBS

100x Pen/Strep

6,06 mg/ml Ampicillin (10000 U/ml), 10 mg/ml Streptomycin
(10mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
(Lagerung bei -20°C)

100x Glutamin

29,23 mg/ml Glutamin (Lagerung bei -20°C)

FCS

JRH Bioscience

G418

100 mg/ml G418 in H₂O, sterilfiltriert
(Lagerung bei -20°C)

Histidinol

1 M Histidinol in H₂O, sterilfiltriert
(Lagerung bei -20°C)

<i>Blasticidin</i>	10 mg/ml Blasticidin in H ₂ O, sterilfiltriert (Lagerung bei -20°C)
<i>Gancyclovir</i>	10 mM Gancyclovir
<i>Polybrene</i>	4 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert

4.7.3 Kulturmedien

<i>für murine Verpackungszelllinien, BHK- 21 und HEK293</i>	1x Pen/Strep, 1x Glutamin, 10% (v/v) FCS DMEM-Grundmedium
<i>für CHO-K1</i>	1x Pen/Strep, 1x Glutamin 10% (v/v) FCS, Ham's F12-Grundmedium

4.7.4 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellen werden in geeigneten Kulturgefäßen bei 37°C und 5% CO₂ in einem nassbegasteten Brutschrank in entsprechendem Medium kultiviert. Je nach Zelldichte wird nach 2 bis 5 Tagen das Medium gewechselt. Spätestens nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen passagiert. Zur Passagierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit TEP trypsinisiert. Die Zellsuspension wird mit Medium vermischt und auf andere Kulturgefäße verteilt.

4.7.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wird mit dem automatischen Zellzähler CASY1 durchgeführt. Dazu werden die Zellen 1:200 in ein Zählgefäß überführt.

4.7.6 Langzeitlagerung von Säugerzellen

Exponentiell wachsende Zellen werden gewaschen, trypsinisiert und pelletiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in kaltem FCS mit 0,5% DMSO resuspendiert und auf Kryoröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) verteilt. Das Einfrieren erfolgt langsam: 30 min auf Eis, dann 24 h bei -70°C bevor die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgt schnell im 37°C-Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1000rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt.

4.7.7 Durchflussszytometrie (FACS) zur Analyse und Zellsortierung

Die Titerbestimmung eGFP transduzierender Viren, als auch die Anreicherung und Isolierung hochexprimierender, markierter Parentalklone wird mit dem FACS durchgeführt. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TEP trypsinisiert, bevor sie mit Propidiumiodid (PI) (50 µg/ml) angefärbt werden. Danach werden die Zellen mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert. Hierbei werden sowohl Zelltrümmer („forward scatter“ <200) als auch tote Zellen (PI positiv) von der Analyse ausgeschlossen. Die Sortierung wird mit dem FACS *Vantage* SE durchgeführt. Dazu werden die jeweils besten 20% der eGFP exprimierenden Zellen isoliert. Aus dieser Population werden wiederum die besten 20% via Einzelzellsortierung selektiert.

4.7.8 Gentransfermethoden

Transfektion mittels Calciumphosphat/DNA Präzipitation

2xHEBS-Puffer: 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄ in H₂O, pH 7,1

CaCl₂-Lösung: 2,5 M CaCl₂ in H₂O

5·10⁵ Zellen werden pro 9 cm² Platte einen Tag vor Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wird in einem 5 ml Röhrchen 150µl 2x HEBS-Puffer vorgelegt. In einem zweiten Röhrchen werden 15 µl CaCl₂, 5-10µg DNA und H₂O (Σ= 150µl) vermischt. Anschließend wird das DNA-Gemisch unter Vortexen zum HEBS-Puffer getropft. Dies wird für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor das Präzipitat in das Kulturmedium gegeben wird. Nach sechs bis zwölf Stunden wird das Medium der Zellen gewechselt. Für eine stabile Transfektion werden die Zellen nach zwei Tagen auf eine mittlere Platte transferiert und mit Hygromycin-haltigem Selektionsmedium 14 Tage kultiviert (Murine Zellen: 200 U/ml).

Transfektion mittels GenePorter™ (GeneTherapySystems, Inc)

Die Transfektion wird in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Targeting Transfektion

Der Kassettenaustausch wird in BHK-21 und HEK293-Zellen mittels Calciumphosphat/DNA Präzipitation durchgeführt. Dafür werden 10 µg des FLP kodierenden Plasmids pSVFLPe und 2 µg des Austauschvektors je 6-Loch Platte verwendet.

Für die Transfektion der CHO-K1 Zellen wird das GenePorter Transfektionssystem verwendet. In diesem Fall werden 1,5 µg pSVFLPe mit 0,5 µg des jeweiligen Austauschvektors vermischt.

5 Tage nach der Transfektion werden die Zellen unter G418 Selektionsdruck gesetzt (CHO-K1 und BHK-21: 800µg/ml, HEK293: 1500µg/ml). Die entstehenden Subklone können nach etwa 14 Tagen gepickt werden.

Retrovirale Infektion (Markierung/Tagging)

Für die retrovirale Infektion (Markierung) werden jeweils 1·10⁶ BHK, CHO und HEK293-Zellen ausgesät und am folgenden Tag mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,01 entsprechenden Menge viraler Partikel infiziert.

Die Berechnung der MOI erfolgt auf der Grundlage der Poisson Verteilung. Damit ist es möglich festzustellen, wie viele Zellen mit 0, 1, 2 oder mehr Viren infiziert werden. Die Gleichung $P(k) = \frac{x^k}{k!} \cdot e^{-x}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit (P) der Ereignisse k (hier die Anzahl an Viren, die eine Zelle infizieren). X bestimmt die durchschnittliche Anzahl der Ereignisse (hier: MOI).

Für den vorliegenden Fall ist die Poisson Verteilung $P(k) = \frac{MOI^k}{k!} \cdot e^{-MOI}$.

Eine MOI=0,01 ($e^{-0,01}=0,99$) ergibt folgende Verteilung:

$P(0) = 1/1 \cdot 0,99 = 0,99$	→ 99% der Zellen sind nicht infiziert
$P(1) = 0,01/1 \cdot 0,99 = 9,9 \cdot 10^{-3}$	→ 0,99% der Zellen sind mit einem Virus infiziert
$P(k>1) = 1 - P(0) - P(1) = 1 \cdot 10^{-4}$	→ 0,01% der Zellen sind infiziert mit 2 oder mehr Viren

Die virushaltigen Zellkulturüberstände der Verpackungszellen werden mit einem 0,45 µm Filter filtriert und hinsichtlich der MOI verdünnt. Dem Gemisch wird Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugesetzt. Die infizierten Zellen werden nach 3 Tagen unter Hygromycindruck gesetzt (BHK-21 und CHO-K1: 500 U/ml, HEK293: 800 U/ml). Die selektierten Zellgemische könne nach etwa 14 Tagen im Durchflußzytometer sortiert werden.

4.7.9 Bestimmung des retrovirealen Titters

Bestimmung des Titters mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Die Produktion der Retroviren erfolgt 24h von subkonfluenten Verpackungszellen. Zur Bestimmung des retrovirealen Titters auf der Basis der eGFP-Expression werden NIH3T3 Zellen in einer 12-Loch Platte ausgesät ($1 \cdot 10^4$ Zellen/Loch). Am folgenden Tag werden Verdünnungen des zu vermessenden Überstandes angefertigt ($10^0 - 10^4$), mit Polybrene versetzt und in einem finalen Volumen von 300µl auf die NIH3T3 Zellen gegeben. Nach 6h wird das Medium gewechselt. 3 Tage nach der Infektion kann die Bestimmung der GFP-positiven Zellen am FACS durchgeführt werden. Zur Berechnung des Titters dienen neben dem FACS-Ergebnis die Zellzahl der Produzenten und die der infizierten Zellen am Tag der Infektion. Die Angabe des Titters erfolgt in iP (infektiöse Partikel) / $1 \cdot 10^6$ Zellen · 24h.

Bestimmung des Titters mittels Selektion (Anzahl der cfu)

Der retrovirale Titer kann ebenfalls anhand der Anzahl der cfu (*colony forming units*) berechnet werden. Hierfür werden NIH3T3 Zellen auf einer 24-Lochplatte ausgesät ($5 \cdot 10^3$ Zellen /Loch). Die Infektion erfolgt wie zuvor beschrieben ab, allerdings werden die Zellen 3 Tage nach der Infektion unter Hygromycindruck gesetzt (200 U/ml) und für etwa 2 Wochen inkubiert. Die Anzahl der entstehenden Kolonien je Verdünnung wird nach Färbung mit Kristallviolett gezählt.

Bestimmung des Titters mittels Immunofluoreszenzfärbung

Es werden NIH3T3 Zellen einen Tag nach Infektion mit Verdünnungen des viralen Überstandes auf Deckgläschen ausgesät. Die Immunofluoreszenzfärbung erfolgt nach der in Kap. 4.7.10 beschriebenen Methode. Die gefärbten Zellen können nach der Prozedur unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden.

4.7.10 Immunfluoreszenzfärbung

Der Nachweis der KollagenVII Expression erfolgt mittels Immunofluoreszenzfärbung. Diese Methode wird zur Analyse der Virusproduzentenzellen als auch der infizierten Zellen verwendet.

Die zu analysierenden Zellen werden auf Deckgläschen in einer 6-Lochplatte ausgesät ($5 \cdot 10^5$ Zellen). Am folgenden Tage werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 5 min mit Methanol/Aceton (1:1, -20°C) fixiert. Anschließend werden die Zellen 3x mit PBS+3%BSA gewaschen (Raumtemperatur). Die Zellen sind fixiert und gewaschen in PBS+3%BSA bei 4°C für mehrere Wochen haltbar.

Die Zellen werden weiterhin 1x mit PBS+0,1%Saponin (Sigma) gewaschen. Etwa 30-40 μl des primären Antikörpers (mAB Anti-Kollagen TypVII, Klon LH7.2, Sigma) in PBS+0,1%Saponin (1:500) werden auf Parafilm getropft und das Deckgläschen mit den Zellen auf dem Tropfen platziert. Nach 45 min Inkubation werden die Zellen 3x mit PBS+0,1%Saponin gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Ziege, anti-Maus, FITC-markiert, Dianova) erfolgt 1:100 identisch. Nach 30 min Inkubationszeit und 3x waschen (im abgedunkelten Raum) in PBS+0,1%Saponin, sowie 2 min waschen in dH_2O , werden die Deckgläschen blasenfrei auf 10-20 μl Moviöl gelegt, welches auf einen Objektträger getropft wurde. Das Trocknen des Moviöls erfolgt etwa 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Analyse kann nun am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden.

4.8 Proteinanalytik

4.8.1 Zellaufschluss

Zur Bestimmung der Expressionshöhe des Reportergens β -Galaktosidase müssen die wasserlöslichen Proteine der Zellen isoliert werden. Die meistens von einer 6-Loch-Platte stammenden und als Pellet vorliegenden Zellen werden in maximal 150 μl 250 mM Tris-Puffer (pH 7,6) resuspendiert. Anschließend werden die Zellen unter mehrmaligem Wechsel zwischen 37°C -Wasserbad und flüssigem Stickstoff-Bad aufgeschlossen („Freeze & Thaw Lyse“). Nach Zentrifugation für mindestens 10 min bei 15000 rpm und 4°C , kann der Protein-haltige Überstand vermessen werden. Zum Abgleich der Expressionshöhe auf die Zellzahl wird die Anzahl der Zellen von einer Referenzplatte ermittelt.

4.8.2 Nachweis von β -Galaktosidase

Visualisierung der β -Galaktosidase Expression mittels Färbung

Fixierlösung: 2% Formaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd in PBS

Färbelösung: 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal (einzelne Komponenten als 100fach Stocklösung in PBS bzw. X-Gal in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C , für die Anwendung mit PBS verdünnen)

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung für 2 min versetzt. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS werden diese für 10 min in PBS inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung auf die Zellen gegeben. Bereits nach 30 min Inkubation

im Brutschrank bei 37°C, spätestens aber nach 24h kann die Expression der β -Galaktosidase in Form von blau gefärbten Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden.

Bestimmung der Enzymaktivität

<i>Substratpuffer:</i>	60 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM HCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -Mercapthoethanol
<i>MUG-Puffer:</i>	4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactosid in Dimethylformamid (Lagerung in Dimethylformamid bei -20°C)
<i>Reaktionspuffer:</i>	1/50 MUG-Puffer in Substratpuffer

Die bakterielle β -Galaktosidase kann das 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactosid in Galaktose und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon spalten. Letzteres emittiert bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm Licht der Wellenlänge von 450 nm. Die gemessene Lichtmenge ist direkt proportional zur β -Galaktosidase Aktivität und gibt daher die Höhe der β -Galaktosidaseexpression in den Zellen wider.

In einer 96-Loch Platte für optische Tests werden in den Löchern der ersten Reihe 180 μl bzw. 190 μl für die Messung der Aktivität des β -Galaktosidase-Standards, in die restlichen Löcher jeweils 100 μl Substrat-Puffer vorgelegt. In die Löcher der ersten Reihe werden weiterhin 10 μl eines β -Galaktosidase-Standards bzw. 20 μl des Zellüberstandes gegeben. Anschließend werden aus den Löchern der ersten Reihe 100 μl der Suspension entnommen und in je ein Loch der zweiten Reihe überführt. Diese 1:2 Verdünnung wird bis zur letzten Reihe fortgesetzt. Die sich nun in jedem Loch befindende 100 μl Protein-Verdünnung wird mit je 100 μl Reaktionspuffer versetzt. Anschließend wird nach Anregung mit 365 nm die Lichtemission bei 450 nm automatisch zum Zeitpunkt 0, 6 und 12 min gemessen (Wallace Victor²). Die β -Galaktosidase-Aktivität der Zellextrakte lässt sich anhand der Standardreihe berechnen.

4.8.3 Analyse der Antikörperexpression mittels ELISA

<i>Block-Puffer:</i>	PBS + 3%BSA + 0,05% Tween
<i>Verdünnungspuffer:</i>	Block-Puffer 1:12 verdünnt mit dH_2O
<i>Carbonatpuffer:</i>	64 mM Na_2CO_3 , 136 mM NaHCO_3 in dH_2O lösen und pH 9,6 einstellen
<i>Waschpuffer:</i>	PBS + 0,1%Tween
<i>Substratpuffer:</i>	NaHPO_4 , Zitronensäure, o-Phenaldiamindihydrochlorid, H_2O_2 in H_2O (bidest.)

Die Produktion der Antikörper verläuft innerhalb 24 h mit subkonfluenten Zellen. Die Überstände werden nach 24 h abgenommen, filtriert (0,45 μm) und können anschließend entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die Analyse verwendet werden. Gleichzeitig wird die Zellzahl der Produzentenzellen bestimmt, um die Produktivität normieren zu können. Die Angabe der spezifischen Produktivität erfolgt als pcd (pg Antikörper pro Zelle pro Tag).

Am ersten Tag der Analyse werden Mikrotiterplatten beschichtet. Dazu wird Carbonatpuffer 1:1000 mit dem ersten Antikörper vermischt (Goat-anti-human Kappa, Caltag) und 100µl der Lösung auf jedes 96-Loch gegeben. Die Platte wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die Platte 3x mit Waschpuffer gewaschen und dann 30 min mit dem Block-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert (300µl/Loch). Nach erneutem Waschen (3x) werden Proben, beziehungsweise Standard (human IgG1 Kappa, Sigma) aufgetragen. Dazu werden 200µl der Proben, beziehungsweise eine 1:10000 Verdünnung des Standards (in Verdünnungspuffer) in die erste Reihe pipettiert. In jede weitere Reihe werden 100µl des Verdünnungspuffers vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette wird die Verdünnung durchgeführt. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte 6x gewaschen und danach mit 100µl/Loch einer Antikörperlösung inkubiert (Peroxidase gekoppelter goat-anti-human IgG, H+L, Caltag; 1:3000 in Verdünnungspuffer). Die Platte wird nach einer Stunde Inkubation (RT) 6x gewaschen. Nun erfolgt die Zugabe des Substratpuffers (100µl/Loch). Das Abstoppen der Farbreaktion geschieht durch die Zugabe 1N H₂SO₄. Nun kann die Platte mit einem ELISA-Reader gelesen werden

5 Vektoren

5.1 Verwendete Vektoren

pEMCGALEO (2005)	Verhoeyen et al., 2001
pEMCeGFPEO (2006)	Verhoeyen et al., 2001
pTAREMCV (2001)	Verhoeyen et al., 2001
pAK1 (2457)	Fa. Symphogen
pAK2 (2788)	Fa. Symphogen
pAK3 (2789)	Fa. Symphogen
pAK4 (2790)	Fa. Symphogen
pCeb (2580)	Cosset et al., 1995
pCMV1MLVgp1 (820)	Schumacher L.
pENVAhis (2799)	Spitzer et al., 1999
pSVFLPe (1692)	Maaß, nicht publiziert; Die FLPe Rekombinase wird von einem SV40 Promotor gesteuert.
pBSPacΔP (456)	De la Luna, 1988
pSBC2Gal (2084)	Seibler, J.
pSBC2Neo (1239)	Seibler, J.
pMFGeGFP (1646)	Verhasselt et al., 1998
pMSCVhcolVII	Zanta-Boussif, M. unpubliziert

(2581)

pBullet-MinSin3-
N3-EF1 alpha-
hColVII
(2796)

Merten, O.W.

pJSARGFP

Markusic et al., 2005

5.2 Hergestellte Vektoren

pTAGeGFP
(2544)

Das eGFP-Reportergen wurde mit *NotI/SacI* aus dem Vektor pEMCeGFPEO herausgeschnitten und in den *NotI/SacI* geschnittenen Vektor pEMCGALEO kloniert.

pTAREMCV
F5neu
(2551)

Der Vektor pSTmcsEIF5neu wurde mit *ClaI/HindIII* geschnitten und das 2,4 kb aufgefüllte Fragment mit dem *NruI/HindIII* geschnittenen und aufgefüllten 6,7 kb Fragment des Vektors pTAREMCV ligiert um einen Targetingvektor zu erhalten.

pTARDKL
(2751)

Das 800 bp Fragment des *NheI/SacII* geschnittenen Vektors pTARCMV1 wurde mit dem 2,7 kb Fragment des ebenfalls *NheI/SacII* geschnittenen Vektors pTARDht ligiert, um einen Targetingvorläufervektor mit einem CMV-Promotor um zu erhalten.

pTARDKL-N
(2570)

Der Vektor pTARDKL wurde mit *NotI* geschnitten, aufgefüllt und wieder ligiert.

pEMTAR
(2571)

Die Vektoren pTARDKL und pAK1 wurden mit *NotI* geschnitten, aufgefüllt und anschließend mit *ScaI* geschnitten. Das 2,2 kb Fragment von pTARDKL und das 1,0 kb Fragment von pAK1 wurden isoliert und ligiert.

pMLIReGFP
(2573)

Die retrovirale Kasette des Vektors pMFGeGFP wurde mit *ScaI/HindIII* ausgeschnitten mit Klenow aufgefüllt und in den *NaeI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pEMTAR ligiert.

pMLCMeGFP
(2572)

Die retrovirale Kasette des Vektors pMFGeGFP wurde mit *ScaI/HindIII* ausgeschnitten, mit Klenow aufgefüllt und in den *NaeI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pTARDKL-N ligiert.

pMLCMeGFPprev
(2796)

Analog zu pMLCMeGFP enthält dieser Vektor die retrovirale Kasette aus pMFGeGFP, allerdings in der reversen Orientierung.

pMSIReGFP
(2582)

Die cDNA des KollagenVII-Gens wurde mittels *EcoRI* aus dem Vektor pMSIRcolVII herausgeschnitten und gegen das mit *EcoRI* isolierte eGFP-Gen aus pJSARGFP getauscht.

pSINeGFP

Die cDNA des KollagenVII-Gens wurde mittels *EcoRI* aus dem Vektor

(2794)	pSINcolVII herausgeschnitten und gegen das mit <i>EcoRI</i> isolierte eGFP-Gen aus pJSARGFP getauscht.
pMSIRcolVII (2793)	Die 11 kb große retrovirale Kasette des Vektors pMSCVhcolVII wurde mit <i>SgrAI</i> und <i>SspI</i> ausgeschnitten, aufgefüllt und in den <i>NaeI</i> geschnittenen Vektor pEMTAR ligiert.
pMSCMcolVII (2791)	Die 11 kb große retrovirale Kasette des Vektors pMSCVhcolVII wurde mit <i>SgrAI</i> und <i>SspI</i> ausgeschnitten, aufgefüllt und in den <i>NaeI</i> geschnittenen Vektor pTARDKL-N ligiert.
pMSCMcolVIIrev (2792)	Analog zu pMSCMcolVII enthält dieser Targetingvektor die retrovirale Kasette aus pMSCVhcolVII, allerdings in der reversen Orientierung.
pSINcolVII (2766)	Die retrovirale Kasette (SIN) des Vektors pBullet-MinSin3-N3-EF1 alpha-hColVII wurde mit <i>ClaI/NotI</i> herausgeschnitten, aufgefüllt und mit dem 2,7 kb Fragment des <i>ClaI/NaeI</i> geschnittenen Vektor pMSIRcolVII ligiert.

6 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
β -gal	β -Galactosidase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bsr	Blasticidinresistenz
C	Cytosin
CMV	Cytomegalovirus
Cre	<i>cyclization recombination</i> (Cre-Rekombinase)
CTP	Cytidintriphosphat
DME	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EB	<i>Epidermolysis bullosa</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eGFP/Neo	Fusionsprotein aus eGFP und Neo
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
env	Retrovirales Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
Flp	Flp-Rekombinase
FRT	<i>Flp recognition target</i> (Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase)
G	Guanin
gag/pol	Retrovirale Strukturgene
GTP	Guanosintriphosphat
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His	Histidinol
HSV	Herpes simplex virus
Hyg	Hygromycin-B-Phosphotransferase
HygTk	Fusion aus Hyg und Tk
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
iP	Infektiöse Partikel
Kap.	Kapitel
kb	1000 Basen

l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase
loxP	<i>locus of X-over</i> (Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MoMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
min	Minute
mAK	Monoklonaler Antikörper
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
MPSV	<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>
ng	Nanogramm
Neo	Neomycinphosphotransferase
ori	origin of replication
p(A)	poly(A)
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
pcd	Pikogramm pro Zelle pro Tag
pg	Pikogramm
poly(A)	Polyadenylierungssequenz
RDEB	Rezessive dystrophe <i>Epidermolysis Bullosa</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Tk	Thymidinkinase
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
vgl.	vergleiche
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)

7 Literaturverzeichnis

- Albritton, L.M., L.Tseng, D.Scadden, and J.M.Cunningham. 1989. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*. **57**: 659-666.
- Aldrich, T.L., A.Viaje, and A.E.Morris. 2003. EASE vectors for rapid stable expression of recombinant antibodies. *Biotechnol.Prog.* **19**: 1433-1438.
- Aldrich, T.L., J.N. Thomas and A.E. Morris. 1998. Improved bicistronic mammalian expression vectors using expression augmenting sequence element (EASE). *Cytotechnology* **28**: 9-17.
- Andersen, D.C. and D.E.Reilly. 2004. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 456-462
- Andersen, D.C. and Lynne Krummen. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 117-123
- Artelt, P., R.Grannemann, C.Stocking, J.Friel, J.Bartsch, and H.Hauser. 1991. The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene*. **99**: 249-254.
- Bacsi, S.G. and P.J.Wejksnora. 1986. Effect of increase in ploidy on the activation of nucleolar organizer regions in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Exp.Cell Res.* **165**: 283-289.
- Bae, S.W., Hong, H. J., Lee, G. M. 1995. Stability of transfectomas producing chimeric antibody against the pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus during a long-term culture. *Biotech Bioeng.* **47**: 243-251
- Baer, A., D.Schubeler, and J.Bode. 2000. Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry*. **39**: 7041-7049.
- Baer, A. and J.Bode. 2001. Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr.Opin.Biotechnol.* **12**: 473-480.
- Barnes, L.M., C.M.Bentley, and A.J.Dickson. 2003. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol.Bioeng.* **81**: 631-639.
- Barquinero, J., H.Eixarch, and M.Perez-Melgosa. 2004. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.* **11 Suppl 1:S3-9.**: S3-S9.
- Bauer, J.W. and M.Laimer. 2004. Gene therapy of epidermolysis bullosa. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **4**: 1435-1443.
- Baum, C., J.Dullmann, Z.Li, B.Fehse, J.Meyer, D.A.Williams, and C.von Kalle. 2003. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **101**: 2099-2114.
- Bethke, B. and B.Sauer. 1997. Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2828-2834.
- Bianchi, A.A. and J.T.McGrew. 2003. High-level expression of full-length antibodies using trans-complementing expression vectors. *Biotechnol.Bioeng.* **84**: 439-444.

- Blesch, A. 2004. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods*. **33**: 164-172.
- Bouhassira, E.E., K.Westerman, and P.Leboulch. 1997. Transcriptional behavior of LCR enhancer elements integrated at the same chromosomal locus by recombinase-mediated cassette exchange. *Blood*. **90**: 3332-3344.
- Bowtell, D.D., S.Cory, G.R.Johnson, and T.J.Gonda. 1988. Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J.Virol*. **62**: 2464-2473.
- Brezinsky, S.C., G.G.Chiang, A.Szilvasi, S.Mohan, R.I.Shapiro, A.MacLean, W.Sisk, and G.Thill. 2003. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J.Immunol.Methods*. **277**: 141-155.
- Bukrinsky, M.I., N.Sharova, M.P.Dempsey, T.L.Stanwick, A.G.Bukrinskaya, S.Haggerty, and M.Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. **89**: 6580-6584.
- Burns, J.C., T.Friedmann, W.Driever, M.Burrascano, and J.K.Yee. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 8033-8037.
- Chadd, H.E. and S.M.Chamow. 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Curr.Opin.Biotechnol*. **12**: 188-194.
- Chen, M., N.Kasahara, D.R.Keene, L.Chan, W.K.Hoeffler, D.Finlay, M.Barcova, P.M.Cannon, C.Mazurek, and D.T.Woodley. 2002. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat.Genet*. **32**: 670-675.
- Chen, S.T., A.Iida, L.Guo, T.Friedmann, and J.K.Yee. 1996. Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. **93**: 10057-10062.
- Chong, H. and R.G.Vile. 1996. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Ther*. **3**: 624-629.
- Chuck, A. S., Palsson, B. O. 1992. Population balance between producing and nonproducing hybridoma clones is very sensitive to serum level, state of inoculum, and medium composition. *Biotech. Bioeng*. **39**: 354-360
- Coffin, J. M. 1992. Structure and Classification of Retroviruses. In "The Retroviridae". Plenum Press New York and London.
- Cosset, F.L., Y.Takeuchi, J.L.Battini, R.A.Weiss, and M.K.Collins. 1995. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J.Virol*. **69**: 7430-7436.
- Danos, O. and R.C.Mulligan. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 6460-6464.
- Davis, J.L., R.M.Witt, P.R.Gross, C.A.Hokanson, S.Jungles, L.K.Cohen, O.Danos, and S.K.Spratt. 1997. Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Hum.Gene Ther*. **8**: 1459-1467.
- Dirks, W., C.Mielke, S.Karreman, B.Haase, M.Wirth, W.Lindenmaier, and H.Hauser. 1994. Applications of expression vectors containing bicistronic transcription units in mammalian cells. Springer Verlag
- Douin, V., S.Bornes, L.Creancier, P.Rochaix, G.Favre, A.C.Prats, and B.Couderc. 2004. Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. *BMC.Biotechnol*. **4**:16.: 16.

- Emerman, M. and H.M.Temin. 1984. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell*. **39**: 449-467.
- Emerman, M. and H.M.Temin. 1986. Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. *Mol.Cell Biol.* **6**: 792-800.
- Fann, C. H., Guirgis F., Chen G., Lao M. S., Piret J. M. 2000. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotech. Bioeng.* **69**: 204-212.
- Feng, Y.Q., J.Seibler, R.Alami, A.Eisen, K.A.Westerman, P.Leboulch, S.Fiering, and E.E.Bouhassira. 1999. Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J.Mol.Biol.* **292**: 779-785.
- Fernex, C., P.Dubreuil, P.Mannoni, and C.Bagnis. 1997. Cre/loxP-mediated excision of a neomycin resistance expression unit from an integrated retroviral vector increases long terminal repeat-driven transcription in human hematopoietic cells. *J.Virol.* **71**: 7533-7540.
- Fincham, V.J. and J.A.Wyke. 1991. Differences between cellular integration sites of transcribed and nontranscribed Rous sarcoma proviruses. *J.Virol.* **65**: 461-463.
- Forestell, S.P., J.S.Dando, J.Chen, P.de Vries, E.Bohnelein, and R.J.Rigg. 1997. Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Ther.* **4**: 600-610.
- Fouser, L.A., S.L.Swanberg, B.Y.Lin, M.Benedict, K.Kelleher, D.A.Cumming, and G.E.Riedel. 1992. High level expression on a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody: genomic kappa sequences improve expression in COS and CHO cells. *Biotechnology (N.Y.)*. **10**: 1121-1127.
- Frame, K. K., Hu W.-S., 1990. The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotech. Bioeng.* **35**: 469-476
- Francastel, C., M.C.Walters, M.Groudine, and D.I.Martin. 1999. A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell*. **99**: 259-269.
- Ghattas, I.R., J.R.Sanes, and J.E.Majors. 1991. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol.Cell Biol.* **11**: 5848-5859.
- Grez, M., E.Akgun, F.Hilberg, and W.Ostertag. 1990. Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**: 9202-9206.
- Gurtu, V., G.Yan, and G.Zhang. 1996. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **229**: 295-298.
- Hacein-Bey-Abina, S. (a), C.von Kalle, M.Schmidt, M.P.McCormack, N.Wulffraat, P.Leboulch, A.Lim, C.S.Osborne, R.Pawliuk, E.Morillon, R.Sorensen, A.Forster, P.Fraser, J.I.Cohen, B.G.de Saint, I.Alexander, U.Wintergerst, T.Freboung, A.Aurias, D.Stoppa-Lyonnet, S.Romana, I.Radford-Weiss, F.Gross, F.Valensi, E.Delabesse, E.Macintyre, F.Sigaux, J.Soulier, L.E.Leiva, M.Wissler, C.Prinz, T.H.Rabbitts, F.Le Deist, A.Fischer, and M.Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. **302**: 415-419.
- Hacein-Bey-Abina, S. (b), C.von Kalle, M.Schmidt, F.Le Deist, N.Wulffraat, E.McIntyre, I.Radford, J.L.Villeval, C.C.Fraser, M.Cavazzana-Calvo, and A.Fischer. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* **348**: 255-256.

- Hansen, J., T.Floss, P.Van Sloun, E.M.Fuchtbauer, F.Vauti, H.H.Arnold, F.Schnutgen, W.Wurst, H.von Melchner, and P.Ruiz. 2003. A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 9918-9922.
- Harries, M., N.Phillipps, R.Anderson, G.Prentice, and M.Collins. 2000. Comparison of bicistronic retroviral vectors containing internal ribosome entry sites (IRES) using expression of human interleukin-12 (IL-12) as a readout. *J.Gene Med.* **2**: 243-249.
- Haurum, J. and S.Bregenholt. 2005. Recombinant polyclonal antibodies: therapeutic antibody technologies come full circle. *IDrugs.* **8**: 404-409.
- Hennecke, M., M.Kwissa, K.Metzger, A.Oumard, A.Kroger, R.Schirmbeck, J.Reimann, and H.Hauser. 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3327-3334.
- Herman, S.A. and J.M.Coffin. 1986. Differential transcription from the long terminal repeats of integrated avian leukosis virus DNA. *J.Virol.* **60**: 497-505.
- Hoeben, R.C., A.A.Migchielsen, R.C.van der Jagt, H.van Ormondt, and A.J.van der Eb. 1991. Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J.Virol.* **65**: 904-912.
- Holmes-Son, M.L., R.S.Appa, and S.A.Chow. 2001. Molecular genetics and target site specificity of retroviral integration. *Adv.Genet.* **43:33-69.**: 33-69.
- Hotta, A., M.Kamihira, K.Itoh, M.Morshed, Y.Kawabe, K.Ono, H.Matsumoto, K.Nishijima, and S.Iijima. 2004. Production of anti-CD2 chimeric antibody by recombinant animal cells. *J.Biosci.Bioeng.* **98** : 298-303.
- Ikeda, Y., Y.Takeuchi, F.Martin, F.L.Cosset, K.Mitrophanous, and M.Collins. 2003. Continuous high-titer HIV-1 vector production. *Nat.Biotechnol.* **21**: 569-572.
- Israel, D.I. and R.J.Kaufman. 1989. Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4589-4604.
- Jahner, D., H.Stuhlmann, C.L.Stewart, K.Harbers, J.Lohler, I.Simon, and R.Jaenisch. 1982. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature.* **298**: 623-628.
- Kaetzel, D.M. and J.H.Nilson. 1988. Methotrexate-induced amplification of the bovine lutropin genes in Chinese hamster ovary cells. Relative concentration of the alpha and beta subunits determines the extent of heterodimer assembly. *J.Biol.Chem.* **263**: 6344-6351.
- Kaleko, M., J.V.Garcia, W.R.Osborne, and A.D.Miller. 1990. Expression of human adenosine deaminase in mice after transplantation of genetically-modified bone marrow. *Blood.* **75**: 1733-1741.
- Kaplan, A.H. and R.Swanstrom. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**: 4528-4532.
- Kariya, Y., K.Ishida, Y.Tsubota, Y.Nakashima, T.Hirosaki, T.Ogawa, and K.Miyazaki. 2002. Efficient expression system of human recombinant laminin-5. *J.Biochem.(Tokyo).* **132**: 607-612.
- Karreman, C., S.Karreman, and H.Hauser. 1996. Retroviral infection of Syrian hamster BHK cells depends on age and susceptibility toward sialidase. *Virology.* **220**: 46-50.
- Karreman, S., H.Hauser, and C.Karreman. 1996. On the use of double FLP recognition targets (FRTs) in the LTR of retroviruses for the construction of high producer cell lines. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1616-1624.

- Katz, R.A., K.Gravuer, and A.M.Skalka. 1998. A preferred target DNA structure for retroviral integrase in vitro. *J.Biol.Chem.* **273**: 24190-24195.
- Kaufman, K.D., B.Rapoport, P.Seto, G.D.Chazenbalk, and R.P.Magnusson. 1989. Generation of recombinant, enzymatically active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in the sera of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J.Clin.Invest.* **84**: 394-403.
- Kellendonk, C., F.Tronche, A.P.Monaghan, P.O.Angrand, F.Stewart, and G.Schutz. 1996. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1404-1411.
- Kim, S.H., S.S.Yu, J.S.Park, P.D.Robbins, C.S.An, and S.Kim. 1998. Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J.Virol.* **72**: 994-1004.
- Kim, S. J., Kim, N. S., Ryu, C. J., Hong, H. J., Lee, G. M. 1998. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotech. Bioeng.* **58**: 73-84
- Kitamura, Y., Y.M.Lee, and J.M.Coffin. 1992. Nonrandom integration of retroviral DNA in vitro: effect of CpG methylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 5532-5536.
- Kito, M., S.Itami, Y.Fukano, K.Yamana, and T.Shibui. 2002. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **60**: 442-448.
- Klages, N., R.Zufferey, and D.Trono. 2000. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol.Ther.* **2**: 170-176.
- Klehr, D., K.Maass, and J.Bode. 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry.* **30**: 1264-1270.
- Köhler, G. 1980. Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77**: 2197-2199.
- Kuhn, R., F.Schwenk, M.Aguet, and K.Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science.* **269**: 1427-1429.
- Leclercq, I., F.Mortreux, M.Cavrois, A.Leroy, A.Gessain, S.Wain-Hobson, and E.Wattel. 2000. Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vivo. *J.Virol.* **74**: 2305-2312.
- Lee, G.M., A.Varma, and B.O.Palsson. 1991. Application of population balance model to the loss of hybridoma antibody productivity. *Biotechnol.Prog.* **7**: 72-75.
- Lewis, P., M.Hensel, and M.Emerman. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* **11**: 3053-3058.
- Li, Z., J.Dullmann, B.Schiedlmeier, M.Schmidt, C.von Kalle, J.Meyer, M.Forster, C.Stocking, A.Wahlers, O.Frank, W.Ostertag, K.Kuhlcke, H.G.Eckert, B.Fehse, and C.Baum. 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**: 497.
- Li, X., X.Zhao, Y.Fang, X.Jiang, T.Duong, C.Fan, C.C.Huang, and S.R.Kain. 1998. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J.Biol.Chem.* **273**: 34970-34975.
- Liu, W., Y.Xiong, and M.Gossen. 2006. Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells. *J.Mol.Med.* **84**: 57-64.
- Loew, R., N.Selevsek, B.Fehse, D.von Laer, C.Baum, A.Fauser, and K.Kuehlcke. 2004. Simplified generation of high-titer retrovirus producer cells for clinically relevant retroviral vectors by reversible inclusion of a lox-P-flanked marker gene. *Mol.Ther.* **9**: 738-746.

- Logie, C. and A.F.Stewart. 1995. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 5940-5944.
- Loh, T.P., L.L.Sievert, and R.W.Scott. 1990. Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol.Cell Biol.* **10**: 4045-4057.
- Mann, R., R.C.Mulligan, and D.Baltimore. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell.* **33**: 153-159.
- Markovitz, D., S.Goff, and A. Bank. (1988). A safe packaging cell line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Vir.* **62 (4)**: 1120-1124
- Martin, D.I. and E.Whitelaw. 1996. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays.* **18**: 919-923.
- McLeod, M., S.Craft, and J.R.Broach. 1986. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol.Cell Biol.* **6**: 3357-3367.
- Merten, O.W. 2004. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J.Gene Med.* **6 Suppl 1**: 105-124.
- Metzger, D., J.Clifford, H.Chiba, and P.Chambon. 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 6991-6995.
- Metzger, D. and R.Feil. 1999. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr.Opin.Biotechnol.* **10**: 470-476.
- Mielke, C., K.Maass, M.Tummler, and J.Bode. 1996. Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors. *Biochemistry.* **35**: 2239-2252.
- Mielke, C., M.Tummler, D.Schubeler, H.von, I, and H.Hauser. 2000. Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene.* **254**: 1-8.
- Miller, A.D. and C.Buttimore. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol.Cell Biol.* **6**: 2895-2902.
- Miller, A.D. and G.J.Rosman. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques.* **7**: 980-6, 989.
- Miller, D.G., M.A.Adam, and A.D.Miller. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol.Cell Biol.* **10**: 4239-4242.
- Naviaux, R.K., E.Costanzi, M.Haas, and I.M.Verma. 1996. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J.Virol.* **70**: 5701-5705.
- Newman, R., J.Alberts, D.Anderson, K.Carner, C.Heard, F.Norton, R.Raab, M.Reff, S.Shuey, and N.Hanna. 1992. "Primatization" of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4. *Biotechnology (N.Y.).* **10**: 1455-1460.
- O'Gorman, S., D.T.Fox, and G.M.Wahl. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**: 1351-1355.
- Ortiz-Urda, S., B.Thyagarajan, D.R.Keene, Q.Lin, M.Fang, M.P.Calos, and P.A.Khavari. 2002. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat.Med.* **8**: 1166-1170.
- Ortiz-Urda, S., B.Thyagarajan, D.R.Keene, Q.Lin, M.P.Calos, and P.A.Khavari. 2003. PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Hum.Gene Ther.* **14**: 923-928.

- Ory, D.S., B.A.Neugeboren, and R.C.Mulligan. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93** : 11400-11406.
- Page, M.J. and M.A.Sydenham. 1991. High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology (N.Y.)*. **9**: 64-68.
- Pallavicini, M.G., P.S.DeTeresa, C.Rosette, J.W.Gray, and F.M.Wurm. 1990. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* **10**: 401-404.
- Paulin, R.P., T.Ho, H.J.Balzer, and R.Holliday. 1998. Gene silencing by DNA methylation and dual inheritance in Chinese hamster ovary cells. *Genetics*. **149**: 1081-1088.
- Pruss, D., R.Reeves, F.D.Bushman, and A.P.Wolffe. 1994. The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *J.Biol.Chem.* **269**: 25031-25041.
- Rigg, R.J., J.Chen, J.S.Dando, S.P.Forestell, I.Plavec, and E.Bohnelein. 1996. A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology* **218**: 290-295.
- Riviere, I., K.Brose, and R.C.Mulligan. 1995. Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 6733-6737.
- Rohdewohld, H., H.Weiber, W.Reik, R.Jaenisch, and M.Breindl. 1987. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J.Virol.* **61**: 336-343.
- Roe, T., T.C.Reynolds, G.Yu, and P.O.Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**: 2099-2108.
- Schlake, T. and J.Bode. 1994. Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry*. **33**: 12746-12751.
- Schmidt, F.R. 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 363-372.
- Schübeler, D., K.Maass, and J.Bode. 1998. Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry*. **37**: 11907-11914.
- Seibler, J. and J.Bode. 1997. Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay. *Biochemistry*. **36**: 1740-1747.
- Senecoff, J.F. and M.M.Cox. 1986. Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J.Biol.Chem.* **261**: 7380-7386.
- Sheridan, P.L., M.Bodner, A.Lynn, T.K.Phuong, N.J.DePolo, de la Vega DJ Jr, J.O'Dea, K.Nguyen, J.E.McCormack, D.A.Driver, K.Townsend, C.E.Ibanez, N.C.Sajjadi, J.S.Greengard, M.D.Moore, J.Respass, S.M.Chang, T.W.Dubensky, Jr., D.J.Jolly, and S.L.Sauter. 2000. Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer. *Mol.Ther.* **2**: 262-275.
- Shibagaki, Y. and S.A.Chow. 1997. Central core domain of retroviral integrase is responsible for target site selection. *J.Biol.Chem.* **272**: 8361-8369.
- Simon, D., H.Stuhlmann, D.Jahner, H.Wagner, E.Werner, and R.Jaenisch. 1983. Retrovirus genomes methylated by mammalian but not bacterial methylase are non-infectious. *Nature*. **304**: 275-277.

- Sparacio, S., T.Pfeiffer, H.Schaal, and V.Bosch. 2001. Generation of a flexible cell line with regulatable, high-level expression of HIV Gag/Pol particles capable of packaging HIV-derived vectors. *Mol.Ther.* **3**: 602-612.
- Speers, W.C., J.W.Gautsch, and F.J.Dixon. 1980. Silent infection of murine embryonal carcinoma cells by Moloney murine leukemia virus. *Virology.* **105**: 241-244.
- Spitzer, D., H.Hauser, and D.Wirth. 1999. Complement-protected amphotropic retroviruses from murine packaging cells. *Hum.Gene Ther.* **10**: 1893-1902.
- Stewart ,C.L., H.Stuhlmann, D.Jahner, and R.Jaenisch. 1982. De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**: 4098-4102.
- Strang ,B.L., Y.Ikeda, F.L.Cosset, M.K.Collins, and Y.Takeuchi. 2004. Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells. *Gene Ther.* **11**: 591-598.
- Sun Y., C.Qian, D.Peng, and J.Prieto. 2000. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 plus interleukin 12 changes immunoeffector mechanisms and suppresses helper T cell Type1 cytokine production induced by interleukin alone. *Hum. Gene. Ther.* **11**: 127-138
- Swain, A. and J.M.Coffin. 1992. Mechanism of transduction by retroviruses. *Science.* **255**: 841-845.
- Swain, A. and J.M.Coffin. 1993. Influence of sequences in the long terminal repeat and flanking cell DNA on polyadenylation of retroviral transcripts. *J.Virol.* **67**: 6265-6269.
- Tada, H., T.Kurokawa, T.Seita, T.Watanabe, and S.Iwasa. 1994. Expression and characterization of a chimeric bispecific antibody against fibrin and against urokinase-type plasminogen activator. *J.Biotechnol.* **33**: 157-174.
- Takeuchi, Y., F.L.Cosset, P.J.Lachmann, H.Okada, R.A.Weiss, and M.K.Collins. 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J.Virol.* **68**: 8001-8007.
- Tate, C.G., J.Haase, C.Baker, M.Boorsma, F.Magnani, Y.Vallis, and D.C.Williams. 2003. Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim.Biophys.Acta.* **1610**: 141-153.
- Teich, N.M., R.A.Weiss, G.R.Martin, and D.R.Lowy. 1977. Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines. *Cell.* **12**: 973-982.
- Torrent, C., C.Gabus, and J.L.Darlix. 1994. A small and efficient dimerization/packaging signal of rat VL30 RNA and its use in murine leukemia virus-VL30-derived vectors for gene transfer. *J.Virol.* **68**: 661-667.
- Treisman, J., P.Hwu, S.Minamoto, G.E.Shafer, R.Cowherd, R.A.Morgan, and S.A.Rosenberg. 1995. Interleukin-2-transduced lymphocytes grow in an autocrine fashion and remain responsive to antigen. *Blood.* **85**: 139-145.
- Trill, J.J., A.R.Shatzman, and S.Ganguly. 1995. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* **6**: 553-560.
- Tsukiyama, T., O.Niwa, and K.Yokoro. 1989. Mechanism of suppression of the long terminal repeat of Moloney leukemia virus in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol.Cell Biol.* **9**: 4670-4676.
- Umlauf, S.W. and M.M.Cox. 1988. The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific genetic recombination reaction. *EMBO J.* **7**: 1845-1852.

- van der Loo, J.C., B.L.Liu, A.I.Goldman, S.M.Buckley, and K.S.Chrudimsky. 2002. Optimization of gene transfer into primitive human hematopoietic cells of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood using low-dose cytokines and comparison of a gibbon ape leukemia virus versus an RD114-pseudotyped retroviral vector. *Hum.Gene Ther.* **13**: 1317-1330.
- van Hennik, P.B., M.M.Verstegen, M.F.Bierhuizen, A.Limon, A.W.Wognum, J.A.Cancelas, J.Barquinero, R.E.Ploemacher, and G.Wagemaker. 1998. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. *Blood.* **92**: 4013-4022.
- Vanin, E.F., L.Cerruti, N.Tran, G.Grosveld, J.M.Cunningham, and S.M.Jane. 1997. Development of high-titer retroviral producer cell lines by using Cre-mediated recombination. *J.Virol.* **71**: 7820-7826.
- Verhoeyen E. (2000). Effizient targeting of retroviral FRT tagged chromosomal loci and the production of pigs transgenic for human complement regulatory proteins as donors for xenotransplantation. Dissertation
- Verhoeyen, E., H.Hauser, and D.Wirth. 2001. Evaluation of retroviral vector design in defined chromosomal loci by Flp-mediated cassette replacement. *Hum.Gene Ther.* **12**: 933-944.
- Verma, I.M. and N.Somia. 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.* **389**: 239-242.
- Vernet, M. and J.Cebrian. 1996. cis-acting elements that mediate the negative regulation of Moloney murine leukemia virus in mouse early embryos. *J.Virol.* **70**: 5630-5633.
- Vigna, E. and L.Naldini. 2000. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J.Gene Med.* **2**: 308-316.
- Vijaya, S., D.L.Steffen, and H.L.Robinson. 1986. Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J.Virol.* **60**: 683-692.
- Walsh, G. 2003. Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat.Biotechnol.* **21**: 865-870.
- Weidhaas, J.B., E.L.Angelichio, S.Fenner, and J.M.Coffin. 2000. Relationship between retroviral DNA integration and gene expression. *J.Virol.* **74**: 8382-8389.
- Weidle, U.H., P.Buckel, and J.Wienberg. 1988. Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene.* **66**: 193-203.
- Weinberg, J.B., T.J.Matthews, B.R.Cullen, and M.H.Malim. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J.Exp.Med.* **174**: 1477-1482.
- Williams, S., T.Mustoe, T.Mulcahy, M.Griffiths, D.Simpson, M.Antoniou, A.Irvine, A.Mountain, and R.Crombie. 2005. CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC.Biotechnol.* **5**: 17.
- Wilson, C.A. and M.V.Eiden. 1991. Viral and cellular factors governing hamster cell infection by murine and gibbon ape leukemia viruses. *J.Virol.* **65**: 5975-5982.
- Withers-Ward, E.S., Y.Kitamura, J.P.Barnes, and J.M.Coffin. 1994. Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo. *Genes Dev.* **8**: 1473-1487.
- Wiznerowicz, M., A.Z.Fong, A.Mackiewicz, and R.G.Hawley. 1997. Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development. *Gene Ther.* **4**: 1061-1068.

- Wong, E.T., J.L.Kolman, Y.C.Li, L.D.Mesner, W.Hillen, C.Berens, and G.M.Wahl. 2005. Reproducible doxycycline-inducible transgene expression at specific loci generated by Cre-recombinase mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Res.* **33**: e147.
- Wood,C.R., A.J.Dorner, G.E.Morris, E.M.Alderman, D.Wilson, R.M.O'Hara, Jr., and R.J.Kaufman. 1990. High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells. *J.Immunol.* **145**: 3011-3016.
- Woodley, D.T., D.R.Keene, T.Atha, Y.Huang, R.Ram, N.Kasahara, and M.Chen. 2004. Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol.Ther.* **10**: 318-326.
- Wu, X., J.Holschen, S.C.Kennedy, and K.P.Ponder. 1996. Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression. *Hum.Gene Ther.* **7**: 159-171.
- Wu, X., Y.Li, B.Crise, and S.M.Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* **300**: 1749-1751.
- Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* **22** : 1393-1398.
- Xiong, K.H., Q.C.Liang, H.Xiong, C.X.Zou, G.D.Gao, Z.W.Zhao, and H.Zhang. 2005. Expression of chimeric antibody in mammalian cells using dicistronic expression vector. *Biotechnol.Lett.* **27**: 1713-1717.
- Xu, L., K.Tsuji, H.Mostowski, M.Otsu, F.Candotti, and A.S.Rosenberg. 2004. A convenient method for positive selection of retroviral producing cells generating vectors devoid of selectable markers. *J.Virol.Methods* **118**: 61-67.
- Yang, S., R.Delgado, S.R.King, C.Woffendin, C.S.Barker, Z.-Y.Yang, L.Xu, G.P.Nolan, and G.J.Nabel. 1999. Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum. Gene. Ther.* **10**: 123-132
- Yang,Y., E.F.Vanin, M.A.Whitt, M.Fornerod, R.Zwart, R.D.Schneiderman, G.Grosveld, and A.W.Nienhuis. 1995. Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum.Gene Ther.* **6**: 1203-1213.
- Yap, M.W., S.M.Kingsman, and A.J.Kingsman. 2000. Effects of stoichiometry of retroviral components on virus production. *J.Gen.Virol.* **81**: 2195-2202.
- Yee, J.K., T.Friedmann, and J.C.Burns. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43 Pt A**: 99-112.
- Yoshikawa, T., F.Nakanishi, Y.Ogura, D.Oi, T.Omasa, Y.Katakura, M.Kishimoto, and K.Suga. 2000. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol.Prog.* **16**: 710-715.
- Zaiss, A.K., S.Son, and L.J.Chang. 2002. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J.Virol.* **76**: 7209-7219.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Frau Dr. Dagmar Wirth und Herrn Dr. Hansjörg Hauser in der Arbeitsgruppe Regulation und Differenzierung an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig angefertigt. Daher gilt mein besonderer Dank Dagmar und Hansjörg, zunächst für die Ermöglichung der Dissertation und dann für die ausgezeichnete Betreuung, Unterstützung und stete Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Wehland und Herrn Prof. Dr. Dübel danke ich dafür, dass sie diese Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten. Herrn Prof. Dr. Mendel danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Mein Dank (und meine Bewunderung) gehen weiterhin an alle Kollegen und Freunde aus dem zweiten Stockwerk (ohne MOLI). Obwohl es sicher nicht immer einfach war, alle Gesänge und Kommentare zu ertragen, ward Ihr tapfer und habt zu einem wirklich schönes Arbeitsklima beigetragen. Allen meinen „Viren“ aus D 2.42 bin ich zu ganz besonderem Dank verpflichtet. Ihr hattet nicht einmal die Möglichkeit Reißaus zu nehmen und habt Euch darum wunderbar angepasst. Vielen dank für eine tolle Zeit.

Der Reisegruppe „Hauser“ möchte ich für das Privileg danken, Europa etwas näher kennen gelernt zu haben. Dagmar und Tobias möchte ich für das geduldige Durchsehen des Manuskripts danken und mich außerdem für die vielen „Böcke“, „Promoters“ und „weißen Schimmel“ entschuldigen.

An Maria Höxter geht mein Dank für zahlreiche FACS-Einsätze und an die Familie von „InsertAGene“ für tolle Meetings, spannende Diskussionen und leckere Abendessen.

An dieser Stelle möchte ich nocheinmal Joop (J.) van den Heuvel danken, denn nur durch seine Unterstützung war es mir möglich die Zulassung zur Promotion an der TU Braunschweig zu erlangen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und Sandra, die immer für mich da waren (sind) und die lange Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben.

